

**Untersuchungen zur intestinalen Resorption
von Lysin und Fruktoselysin**

Friedrich Alfke

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554607_0013

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München
(Vorstand: Prof. DDr. Dr.h.c.mult. Johannes Brüggemann)
Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Helmut Erbersdobler

Untersuchungen zur intestinalen Resorption
von Lysin und Fruktoselysin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Friedrich Alfke
aus Bruck

München 1974

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. E. Dahme
Referent:	Prof. Dr. H. Erbersdobler
Korreferent:	Prof. Dr. W. Rössner

Tag der Promotion: 26. 7. 1974



Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Besprechung der Literatur	2
2.1 Resorption von Aminosäuren	2
2.2 Wechselseitige Beeinflussung der Aminosäuren beim intestinalen Transport	5
2.3 Aminosäurederivate	7
2.3.1 DL-Aminosäuren	7
2.3.2 Acyl-Aminosäuren	9
2.3.3 Ketosäuren und Hydroxyanaloge	10
2.3.4 Hitzeschädigung von Proteinen und Aminosäuren	11
2.3.5 Verwertung der Aminosäuren-Zucker- komplexe	14
3. Eigene Untersuchungen	16
3.1 Material und Methoden	16
3.1.1 Untersuchungsmaterial	16
3.1.2 Untersuchungsmethoden	23
3.1.2.1 In vitro Versuche mit umgestülpten Darmsäcken	23
3.1.2.2 In vivo Versuche mit abgebundenen Darmsegmenten	28
3.2 Ergebnisse	30
3.2.1 In vivo Resorption von α - und ξ - Fruktoselysin	30
3.2.2 In vitro Resorptionsversuche (aktiver Transport)	35
3.2.2.1 Resorption von ξ -Fruktoselysin	35
3.2.2.2 Resorption von α -Fruktoselysin	36
3.2.3 Beeinflussung des Aminosäuretrans- ports durch Aminosäurederivate	37
3.2.3.1 Beeinflussung der Threoninresorption durch Acetyllysin	37
3.2.3.2 Beeinflussung der Lysinresorption durch Acetyllysin	39

	Seite
3.2.3.3 Beeinflussung der Threoninresorption durch ξ -Fructoselysin	41
3.2.3.4 Beeinflussung der Lysinresorption durch L-Methionin, Acetyl-Methionin- Calcium und Methioninhydroxyanalog	43
4. Diskussion und Schlußfolgerungen	48
4.1 Material	48
4.2 Beurteilung der Versuchsmethoden	49
4.3 Ergebnisse	50
4.3.1 Aktiver Transport	50
4.3.2 Resorption in vivo	51
4.3.3 Werte in Leber, Niere und Harn	52
4.3.4 Beeinflussung der Aminosäurenresorption durch Aminosäurenderivate	54
5. Zusammenfassung, Summary	57
6. Literaturverzeichnis	61
Lebenslauf	82

1. EINLEITUNG

Bei der Hitzeschädigung von Nahrungs- und Futtermitteln entstehen zahlreiche Aminosäurenderivate, Peptide und peptidähnliche Verbindungen, deren Verhalten im Organismus noch wenig geklärt ist. An erster Stelle steht dabei die Frage, ob diese Verbindungen im Verdauungskanal überhaupt freigesetzt werden können bzw. resorbierbar sind. Erst danach muß man sich Überlegungen über das Verhalten resorbierbarer Komplexe im Organismus, d. h. im Einzelnen über die Verwertung, über den Abbau, oder aber über die Ausscheidungsverhältnisse machen.

Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen haben gezeigt, daß die während der Maillardreaktion als Zwischenprodukte entstehenden Aminosäuren-Zuckerkomplexe mengenmäßig von besonderer Bedeutung sind. Zudem sind sie heute schon recht gut definiert und auch präparativ herstellbar. Unter diesen Aminosäuren-Zuckerkomplexen nimmt das ξ -Fruktoselysin wiederum eine Sonderstellung ein, da die ξ -Aminogruppe des Lysins aus dem Proteinverband herausragt und besonders reaktionsfreudig ist.

Aber auch das α -Fruktoselysin kann ähnlich wie die Zuckerkomplexe der anderen Aminosäuren durch Reaktion einer endständigen Aminogruppe im Proteinverband bzw. der in allen Geweben und Futtermitteln vorkommenden freien Aminosäuren entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen zur Resorption von α - und ξ -Fruktoselysin berichtet. In weiteren Versuchen wurde geprüft, inwieweit das ξ -Fruktoselysin bzw. einige andere Aminosäurenderivate die Aufnahme von Aminosäuren im Darm beeinflussen können.

2. BESPRECHUNG DER LITERATUR

2.1 Resorption von Aminosäuren

Aminosäuren werden hauptsächlich im Dünndarm resorbiert. Für die meisten Aminosäuren liegt die größte Transportkapazität nach in vitro Versuchen mit isolierten Darmsegmenten im distalen Jejunum (83, 94). Lediglich Cystin wird hauptsächlich im Duodenum resorbiert (109). Wie jedoch Untersuchungen an Versuchspersonen zeigten (139), wird unter physiologischen Bedingungen der mengenmäßig größte Anteil an Aminosäuren schon im proximalen Jejunum resorbiert. Hierbei treten die L-Aminosäuren schneller in das Pfortaderblut über als die entsprechenden D-Isomere, wie u. a. schon GIBSON und WISEMAN (58) nachwiesen. Dies liegt vor allem daran, daß die meisten L-Aminosäuren unter Energieaufwand auch gegen ein evtl. vorhandenes Konzentrationsgefälle aktiv transportiert werden (sog. "aktiver Transport") (2, 3, 4, 160).

Die genauen Mechanismen dieses aktiven Transports im Intestinum sind noch weitgehend ungeklärt. Wichtige Voraussetzungen dafür sind die Anwesenheit von ATP und Sauerstoff (158) sowie von Natriumionen (142). Eine entscheidende Rolle spielen außerdem die Temperatur (13) und der pH-Wert des Milieus (148). So fanden z. B. THOMPSON et al. in entsprechenden Versuchen eine gesteigerte Resorptionsrate für Glycin und andere Aminosäuren bei Verringerung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,3 (148). Dieser Effekt trat nur im Jejunum und nicht im Ileum auf.

Anhand dieser Tatsachen erarbeiteten CURRAN et al. (35) eine Modellvorstellung für den aktiven Transport der Aminosäuren aus dem Darmlumen in die Epithelzelle. Danach gibt es in der Bürstensaummembran des Darmepithels mobile Transportmoleküle - sogenannte Carrier -, die mit Haftstel-

len für Na^+ -Ionen und Aminosäuren ausgestattet sind. Der Antrieb für die Zellwandpassage von Carrier plus Aminosäure ergibt sich aus dem hohen Konzentrationsgefälle für die Natriumionen vom extracellulären Raum ins Zellinnere. In der Richtung dieses Gefälles gelangen die mit Natriumionen und Aminosäuren beladenen Carrier an die Innenseite der Zellwand, wo sowohl die Natriumionen als auch die jeweiligen Aminosäuren freigegeben werden. Für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Potentials sorgt die in der lumenabgewandten Zellwand lokalisierte, durch die Spaltung von ATP gespeiste "Natriumpumpe", die ständig Na^+ -Ionen aus der Zelle herausbefördert (32, 57, 142). Ähnliche Modellvorstellungen wurden von CRANE (34) für den intestinalen Monosaccharidtransport entwickelt.

Befunde von WISEMAN (159) und anderen Autoren (66, 67) und Ergebnisse von Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung der Aminosäuren beim intestinalen Transport (1, 96, 104, 122, 105, 150) sprechen dafür, daß es für alle Aminosäuren mindestens drei separate Transportsysteme gibt, nämlich für die sauren und neutralen Aminosäuren (47, 96, 159), für Lysin und Arginin (66, 83) sowie ein drittes für die Iminosäuren Prolin und Oxyprolin (67). Diese Einteilung kann jedoch nicht als absolut geltend angesehen werden, da sich die einzelnen Transportsysteme in ihrer Substratspezifität überschneiden (105, 115, 128).

Glutaminsäure und Asparaginsäure werden nicht aktiv transportiert. Sie gelangen entweder durch Diffusion in die Blutbahn oder werden vom Darmgewebe aufgenommen und innerhalb der Mukosa transaminiert (95, 106, 107, 118, 143, 145).

Die Unterschiede in den Transportraten der einzelnen Aminosäuren bei gleicher Konzentration sind vermutlich

auf die Affinität zum Carrier zurückzuführen. In Versuchen von SCHARRER und BRÜGGEMANN (138) mit einem Gemisch von elf Aminosäuren gleich hoher molarer Ausgangskonzentration im Inkubationsmedium wurde die Reihenfolge für den Transport der Aminosäuren festgestellt. Hierbei war die Transportrate für Lysin besonders hoch, vermutlich, weil Lysin und Arginin ein eigenes System besitzen und Arginin nicht im Medium vertreten war. Von den neutralen Aminosäuren wurden Isoleucin, Methionin, Valin und Leucin bevorzugt transportiert, während für den Transport von Histidin, Serin, Threonin, Glycin und Alanin relativ niedrige Werte gefunden wurden. In weiteren Versuchen mit Ratten, die an Hochproteindiäten adaptiert waren, lagen die Werte signifikant höher (134, 135, 141). Daraus ergibt sich, daß die Transportsysteme in der Lage sind, sich an Änderungen in der Ernährung bis zu einem bestimmten Grad anzupassen. Bei Hühnern wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (136).

Beim Passieren der Darmmukosa erfahren die meisten Aminosäuren in geringem Maße eine Metabolisierung, meist in Form von Transaminierungen. Dabei können auch andere Aminosäuren entstehen. Wie schon oben erwähnt, werden z. B. Glutaminsäure und Asparaginsäure in größerem Umfang durch Transaminierung in Alanin umgewandelt (95, 106, 107). Von großer Bedeutung ist auch, daß die resorbierten Aminosäuren zum Teil zur Neusynthese von Proteinen in der Darmepithelzelle herangezogen werden (25). In vivo scheint der Prozentsatz nicht über 2 % des Aminosäurenangebots hinauszugehen (25).

Neben dem Natrium spielen bei der intestinalen Resorption der Aminosäuren auch einige Hormone und Vitamine eine wichtige Rolle, wie etwa das Insulin (140), Thyroxin (25, 89), Vitamin E (76) und besonders das Pyridoxalphosphat (103).

Von besonderem Einfluß ist weiterhin die Anwesenheit von Zuckern im Inkubationsmedium. Bei Versuchen mit isolierten Darmsegmenten zeigte sich, daß Glukose und besonders Galaktose den Transport einiger Aminosäuren beeinträchtigen können, während Fruktose im allgemeinen beschleunigend wirkt (5, 17, 114, 121). Als Erklärung für diese Beeinflussung gibt es zwei Theorien. Nach ALVARADO (5) besitzen die Carrier neben der Haftstelle für Aminosäuren eine zweite für Zucker. Je nach Struktur des Zuckers bzw. der Aminosäure kommt es am Carrier zu einer allosterischen Wechselwirkung, wobei sich entscheidet, ob hierbei die Affinität für den Zucker oder die Aminosäure geringer wird. Nach den Modellvorstellungen von NEWBY und SMYTH (114) besitzen Zucker und Aminosäuren getrennte Transportsysteme. Die Behinderung des Aminosäuretransports soll dadurch zustande kommen, daß beide Systeme um eine gemeinsame Energiequelle konkurrieren.

2.2 Wechselseitige Beeinflussung der Aminosäuren beim intestinalen Transport

Einige Aminosäuren, insbesondere solche mit langen, nicht polaren Seitenketten, beeinflussen andere Aminosäuren beim Transport (2, 3, 59). So behindern einige neutrale Aminosäuren die Resorption der basischen (122). Zum Beispiel wird die Resorption von Lysin durch Cystein oder Isoleucin, Tryptophan, Valin bzw. Prolin beeinträchtigt (104, 105, 113, 128, 144). Dagegen wird in manchen Fällen die Transportgeschwindigkeit bestimmter Aminosäuren sogar erhöht. Besonders die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin werden bei Anwesenheit von Leucin, Methionin und auch Alanin beschleunigt transportiert. Leucin hemmt auf der anderen Seite wieder die neutralen Aminosäuren Alanin und Glycin (144).

Worauf der Mechanismus der gegenseitigen Hemmung bzw. Förderung beruht, ist noch ungeklärt. Es existieren mehrere Theorien. Nach NEWEY und SMYTH haben die neutralen Aminosäuren eine unterschiedliche Affinität zum Carrier, sodaß bei gleichzeitiger Anwesenheit von mehreren neutralen Aminosäuren, diejenigen mit der größten Affinität bevorzugt transportiert werden und somit andere mit geringerer Affinität kompetitiv hemmen (113). Diese Affinität zum Transportvehikel ist abhängig vom stereochemischen Aufbau der Aminosäure.

ROBINSON (128) und auch andere Autoren (130, 131) stellten weiterhin fest, daß zwei Aminosäuren, die um einen gemeinsamen Carrier konkurrieren, sich nicht immer gegenseitig hemmen. Unter bestimmten Umständen wird eine der beiden Aminosäuren sogar beschleunigt transportiert. Dieser Effekt der sog. kompetitiven Acceleration ist offensichtlich von der Konzentration der Aminosäuren im Versuchsmedium abhängig. So wurde z. B. Methionin beschleunigt transportiert, wenn Leucin nur in geringer Konzentration im Versuchsmedium vertreten war. Wurde dagegen die Konzentration des Leucins wesentlich erhöht, so schlug die anfängliche Transportbeschleunigung des Methionins in eine kompetitive Hemmung um.

ROBINSON und Mitarbeiter entdeckten auch noch ein weiteres Phänomen der gegenseitigen Beeinflussung unter den Aminosäuren. Sie legten Stücke von Rattendärmen so lange in ein mit Arginin angereichertes Inkubationsmedium, bis die durch den aktiven Transport verursachten Konzentrationsunterschiede konstant blieben, weil Zufluß (aktiv) und Abfluß (Rückdiffusion aufgrund des Konzentrationsgradienten) gleich groß geworden waren (sogenanntes Fließgleichgewicht, engl. = *steadystate*). Wurde nun dem extracellulären Medium Methionin hinzugefügt, so war der vorherige Gleichgewichtszustand gestört und ein neuer, zusätzlicher Transport von Arginin in die Darmzelle zu re-

gistrieren. ROBINSON vermutet nun, daß durch die Hinzugabe des Methionins das Arginin an der Rückdiffusion aus der Zelle gehindert wurde, wodurch sich die Konzentration an Arginin in der Zelle weiter erhöhen konnte ("Counterflow phenomenon") (102, 128).

REISER und CHRISTIANSEN erklären die Beschleunigung der Resorption von Lysin und Arginin durch einige neutrale Aminosäuren mit der Wechselwirkung zweier Transportsysteme. Demnach gibt es z. B. für Leucin und Lysin zwei verschiedene Transportsysteme, von denen eines die Energie für das andere liefert. Das für den aktiven Transport von Leucin zuständige System ("erstes System") ist von der Anwesenheit von Natriumionen abhängig und benötigt Energie. Das zweite Transportsystem, das Lysin befördert, ist von Natriumunabhängig. Es verbraucht jedoch, um das Einfließen von Lysin in die Zelle beschleunigen zu können, Energie. Diese Energie liefert das vom ersten System herbeigeschaffte intrazelluläre Leucin (123.).

2.3 Aminosäurenderivate

2.3.1 D- und L-Aminosäuren

Mit Ausnahme des Glycins, das noch kein asymmetrisches C-Atom aufweist, gibt es von allen anderen Aminosäuren zumindest zwei Isomere, die L-Konfiguration und die D-Form. Lediglich bei der chemischen Aminosäuresynthese wird ein racemisches Gemisch von D- und L-Formen erhalten.

In entsprechenden Versuchen wurde festgestellt, daß die D-Aminosäuren sehr viel langsamer als die L-Formen resorbiert werden (4, 161). L-Alanin und L-Histidin wurden beispielsweise doppelt bzw. sechsmal so schnell resorbiert wie die entsprechenden D-Isomere. Allgemein wird ange-

nommen, daß die Resorption der D-Formen hauptsächlich per Diffusion erfolgt (2, 93, 161), da bei niedrigen Temperaturen oder bei Hemmung der für den aktiven Transport notwendigen Stoffwechselenzyme die Unterschiede zu den L-Aminosäuren verschwinden. JERVIS wies allerdings für D-Methionin einen aktiven Transport nach (77, 78, 79). D-Histidin wird dagegen gesichert nicht aktiv transportiert (79).

Die D-Aminosäuren werden sehr unterschiedlich verwertet: Während das D-Methionin gut vom Organismus in die L-Form umgewandelt werden kann, liegen die Verwertungsraten z.B. für D-Tryptophan, D-Phenylalanin, D-Valin und D-Leucin mit Werten von um oder unter 50 % der entsprechenden L-Isomere, wesentlich darunter (164, 165, 166). Bei manchen Aminosäuren, wie etwa bei Lysin, ist die D-Form völlig unwirksam (15, 62). Wenn die D-Konfiguration einer Aminosäure die entsprechende L-Form ersetzt, wird sie nicht als solche in die Gewebeproteine eingebaut, sondern vielmehr zur L-Form umgebaut (33). Diese Transformation ist, zumindest teilweise, der Wirkung einer D-Aminosäuren-Oxidase (DOX) in der Niere zuzuschreiben. Bei der Umwandlung entstehen Ammoniak und die entsprechende α -Ketosäure, auf die später noch eingegangen wird.

Bei den Aminosäuren Isoleucin und Threonin tritt in der Seitenkette ein weiteres Asymmetriezentrum auf, das zwei weitere Isomere (z. B. alle-L-Threonin und allo-D-Threonin) entstehen läßt. Von den jeweils vier Isomeren sind nur das L-Threonin und das L-Isoleucin wachstumsfördernd (63, 156).

Aus all diesen Gründen werden in der Ernährung des Menschen und der Nutztiere heute mit Ausnahme des Methionins weitgehend die isolierten L-Isomere verwendet.

2.3.2 Acyl-Aminosäuren

Weitere Schwierigkeiten treten auf, wenn zusätzliche Gruppen eingeführt werden. Während D-Tryptophan bei Ratten recht gut verwertet wird (120), ist das N-Acetyl-D-Tryptophan inaktiv (153). N-Acetyl-L-Tryptophan wird dagegen noch gut verwertet. Man vermutet, daß im Gewebe eine Aminosäuren-N-Acylase vorhanden ist, die eine enge Substrat-Spezifität zu den Acetyl-L-Aminosäuren besitzt, aber keine Wirkung auf Acetyl-D-Aminosäuren zeigt (19, 20). Hinzu kommt, daß Acetyl-D-Tryptophan wesentlich schlechter resorbiert wird (14, 129). Allerdings ist diese Verbindung auch bei parenteraler Verabreichung unverwertbar.

Die Acetylierung von L-Methionin bringt keine Nachteile. ERBERSDOBLER et al. fanden in Versuchen mit Küken, daß Acetyl-DL-Methionin-Calcium eine ca. 50%ige Methioninwirksamkeit besitzt. Bei Ratten lag der Prozentsatz höher. Das Acetyl-D-Methionin wird zumindest wesentlich langsamer resorbiert (87). Vermutlich wird nur das Acetyl-L-Methionin genutzt, während die D-Form evtl. von den Mikroorganismen im Verdauungskanal in Methionin umgewandelt werden kann. Die acetylierten Derivate von Cystin und Homocystin, nämlich Diacetyl und Acetyl-Cystin bzw. L-Homocystin können in Cystin umgewandelt werden und somit als Ersatz für Methionin gelten (111, 149). Auch die Isopropyl-Ester des L- und D-Phenylalamins sind ebenso wie die Äthyl-Ester des L-Tryptophans in der Lage, die entsprechenden freien Aminosäuren voll zu ersetzen (163).

Während somit viele an der α -Aminogruppe acetylierte Aminosäuren wachstumsfördernd sind, ist das α -N-Acetyl-L-Lysin unwirksam. Es ist noch nicht geklärt, weshalb Lysin eine Ausnahme bildet. Vermutlich wird diese Verbindung an der ϵ -Aminogruppe oxidiert, noch bevor eine Deacetylierung stattfinden kann. Die entsprechende Acylase kann

dann nicht mehr zur Wirkung kommen (110, 111). Das an der ξ -Aminogruppe substituierte Acetyl-L-Lysin ist dagegen in der Lage, bei lysinarmer Nahrung das Wachstum von Ratten zu fördern (111, 112). BJARNASON und CARPENTER stellten in Versuchen mit wachsenden Ratten eine halb so hohe Wirksamkeit für ξ -N-Acetyl-L-Lysin wie für L-Lysin fest. ξ -N-Propionyl-Lysin dagegen zeigte bei Ratten fast keine Wirkung (21). Hühner können jedoch diese Verbindung verwerten (152). Vor einigen Jahren gelang es PAIK, aus Schweine- und Rattennieren eine ξ -Lysin-Acylase zu isolieren, die ξ -N-Formyl und ξ -N-Acetyl-Lysin hydrolysiert. Gegen größere Acetyl-Gruppen erwies sich dieses Enzym jedoch als unwirksam (86, 117). Auch zwei weitere ξ -substituierte Lysin-derivate, das ξ -N-Cyclohexyl-Lysin und ξ -N-Piperidyl-Lysin, erwiesen sich als Lysinersatz unbrauchbar (16). Das ξ -N-Methyl-Lysin dagegen hat Lysinwirksamkeit (81). Auch α -Dimethyl-Lysin und α -Monomethyl-Lysin unterstützen nicht das Wachstum bei Lysinmangel (61).

2.3.3 Ketosäuren und Hydroxyanaloge

Wie schon weiter oben erwähnt, entsteht bei der Umwandlung der Aminosäuren von der D-Form zur L-Konfiguration u. a. eine α -Ketosäure. Diese α -Ketosäuren wurden in vielen Wachstumsversuchen auf ihre Verfügbarkeit getestet. Fast alle von ihnen können die entsprechende L-Aminosäure ganz oder doch teilweise in der Nahrung ersetzen (30, 101, 162). Die Äthyl-Ester dieser α -Ketosäurenanaloge wie z. B. beim Valin, Leucin und Isoleucin erwiesen sich jedoch als unwirksam (62). Das ist vermutlich auf das Unvermögen des Rattengewebes, diese Ester zu hydrolysieren, zurückzuführen. Die α -Hydroxyanaloge der Aminosäuren werden in die α -Ketosäuren umgewandelt und anschließend, wie bereits beschrieben, reaminiert. So ergaben Versuche

mit wachsenden Hühnerküken für DL-Methioninhydroxy-analog eine Wirksamkeit, die der von L-Methionin gleichkommt (18, 26, 60, 90, 147). Während die meisten bisher untersuchten α -Hydroxy-Analoga der essentiellen Aminosäuren, mit Ausnahme des Cystins, die entsprechende L-Form in der Nahrung fast völlig ersetzen können, vermag α -Hydroxy-Lysin dies nur bei Mikroorganismen (69, 111, 117). Auch eine Acetylierung des Lysinhydroxyanalogs brachte keinen Nutzen. Selbst nach wochenlanger Adaptation zeigte sich keine Lysinwirkung (171).

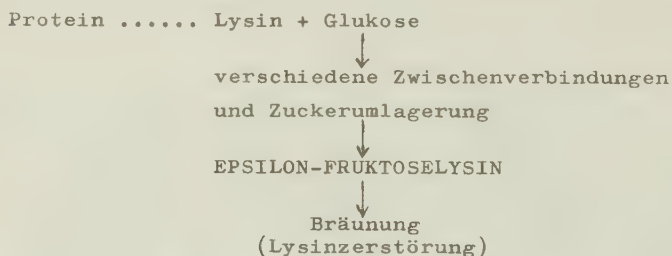
2.3.4 Hitzeschädigung von Proteinen und Aminosäuren

Eine Reihe wichtiger Aminosäurenderivate entsteht bei der Hitzebehandlung von Nahrungs- und Futtermitteln. Die Erhitzung hat neben den dabei gewünschten Vorteilen - Haltbarkeit, Keimarmut, Steigerung der Verdaulichkeit und bessere Schmackhaftigkeit - auch mehr oder weniger schwerwiegende Nachteile. Das Auftreten solcher Nachteile ist von der Temperatur und der Dauer der Hitzeeinwirkung sowie von der Anwesenheit anderer Stoffe, insbesondere von Kohlenhydraten, abhängig. Hierbei spielen die reduzierenden Zucker eine große Rolle. Proteine, die zusammen mit Kohlenhydraten erhitzt werden, zeigen nach einiger Zeit eine mehr oder weniger deutliche Braunfärbung. Es findet hierbei eine Wechselwirkung der Proteine mit reduzierenden Zuckern statt. Diese allgemein als Maillard-Umsetzung oder "nicht enzymatische Bräunung" bekannte Reaktion tritt bei allen Aminosäuren auf (7, 8, 40, 74, 73, 70, 84, 91, 92, 124, 125). Bei den proteingebundenen Aminosäuren ist zu bedenken, daß sie mit ihrer α -Aminogruppe in der Peptidbindung verknüpft und dadurch vor diesen Reaktionen mit reduzierenden Zuckern geschützt sind (68, 85, 88, 168). Lediglich die im Protein endständigen Aminogruppen und die aus der

Proteinstruktur herausragenden NH_2 -Gruppen der basischen Aminosäuren sind reaktionsfähig. Dies trifft insbesondere für die freie ϵ -Aminogruppe des Lysins zu, das damit besonders gefährdet ist. Von den Zuckern reagieren die Aldosen wesentlich rascher als die Ketosen. Im Reaktionsverlauf verhalten sich die Zuckerarten jedoch ähnlich. Die Aldosen verbinden sich mit den Aminosäuren zunächst zu N-Glykosiden. Diese Aldosylaminosäuren sind äußerst labil und wandeln sich rasch in die entsprechende Ketose-Aminosäure um (Amadori-Umlagerung) (168, 73, 74).

Bei Reaktion von D-Glukose mit einer Aminosäure bildet sich auf diese Weise eine D-Fruktose-Aminosäure. Die Ketosen reagieren analog zu Aldose-Aminosäuren (70, 71, 72). Im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion kommt es zur Abspaltung der NH_2 -Gruppe, was einer völligen Zerstörung der entsprechenden Aminosäure gleichkommt. Diese Vorgänge sind jedoch erst bei stärkerer Hitzebelastung mengenmäßig von Bedeutung.

Kurzfassertes Schema der Lysin-Zucker Reaktion:



Während der Mechanismus der Reaktion von Aminosäuren bzw. Proteinen mit reduzierenden Zuckern zumindest im Anfangsstadium bekannt ist (Maillard-Umsetzung), ist die Aminosäureschädigung durch nicht-reduzierende Zucker noch nicht völlig geklärt. Rohrzucker und Raffinose bewirken bei höherer, anhaltender Hitzeeinwirkung ebenfalls

eine Lysinschädigung (49). Es wird jedoch allgemein angenommen, daß Rohrzucker und Raffinose erst in reduzierende Zucker gespalten werden müssen, damit sie reaktionsfähig werden. Unter Umständen kann dies sogar schon bei relativ niedrigen Temperaturen eintreten wie KAREL et al. anhand eines Modellgemisches, das Rohrzucker enthielt und das bei einer Temperatur von nur 55° Celsius erhitzt wurde, nachwies (80).

Werden Proteine allein erhitzt, so treten ebenfalls Aminosäureninaktivierungen auf (22, 155). Die Mechanismen dieser Proteinschädigung sind ebenfalls noch wenig geklärt. Wie in der oben erwähnten Maillard-Reaktion kommt auch hier der freien Epsilon-Gruppe des Lysins eine entscheidende Rolle zu. Als Folge der Hitzebehandlung kondensieren innerhalb der Proteine die Epsilon-Aminogruppen des Lysins und die freien Carboxylgruppen der Amino-dicarbonsäuren (23, 37). Bei Beteiligung von Glutamin entsteht dabei Epsilon-gamma-glutamyl-Lysin durch Kondensation der Epsilon-Aminogruppe des Lysins mit der Amid-Gruppe des Glutamins unter Ammoniakabspaltung (22, 119). Die so entstandenen Aminosäurenderivate müssen jedoch nicht zwangsläufig zu einer Proteinschädigung führen. WAIBEL und CARPENTER konnten kürzlich nachweisen, daß ϵ -(γ -Glutamyl)-Lysin oral verabreicht bei Lysinmangelrationen einen ebenso hohen wachstumsfördernden Effekt hat wie L-Lysin, und zwar sowohl für Ratten als auch für junge Hühner. Vermutlich wird diese Verbindung unverändert im Darm resorbiert und dann in den Nieren hydrolysiert (154).

2.3.5 Verwertung der Aminosäure-Zuckerkomplexe

Wie soeben erwähnt, bildet Lysin mit Glukose N- ξ -Fruktoselysin bzw. mit Laktose das Laktuloselysin. Die so entstandene Lysin-Blockade spielt z. B. bei der Milchpulverherstellung eine große Rolle, da zur Trocknung eine entsprechende Hitzebehandlung notwendig wird und große Mengen an der reduzierenden Laktose vorliegen. Das Fruktoselysin eignete sich nicht als Lysinquelle (97, 98, 99, 100, 169). HORN et al. isolierte aus erhitzten Nahrungsmitteln das Methioninderivat Fruktose-Methionin (75). Für Ratten war diese Verbindung nicht verfügbar, während sie bei Mikroorganismen das Methionin ersetzen konnte. SCARBIERI et al. synthetisierten Fruktose-L-Leucin und Fruktose-L-Tryptophan. Das Fruktose-Leucin wurde im Darm verhältnismäßig gut resorbiert, während das Fruktose-Tryptophan die Darmwand kaum pasierte (133).

HAGAN und Mitarbeiter führten Versuche mit Fruktose-Glycin durch (65). Bei proteinarm gefütterten Ratten war das Fruktose-Glycin eben so gut wie das reine Glycin selbst verwertbar.

Nach Ansicht mancher Autoren haben die Maillard-Komponenten eine abträgliche oder sogar toxische Wirkung (31). Bei Zugabe geringer Mengen an sogenannten Pre-Melanoiden zum Futter wurde bei Ratten eine Appetit- und Wachstumssteigerung registriert. Bei höheren Gaben trat eine Depression des Wachstums ein. ATKINSON und CARPENTER konnten dagegen bei ähnlichen Versuchen keinen toxischen Effekt feststellen (9).

Einen Überblick über die wichtigsten, bisher untersuchten Derivate, gibt Tabelle 1.

Tab. 1 Biologische Wirksamkeit von Derivaten des L-Lysins.

Die Werte werden in Prozent der Wirksamkeit von L-Lysin angegeben, (gemessen im Wachstumsversuch bei einer Lysinmangeldiät mit jungen Ratten oder Hühnerküken).

(ergänzt und etwas modifiziert nach CARPENTER (31))

Gruppe	α -N	ϵ -N
Methyl	0 (a)	+ (c)
Formyl	-	55 (i)
Acetyl	0 (b)	50 (d, e)
Propionyl	-	0 (d) bei Huhn 80 % (f)
Glycyl	100 (e, i)	80 (e)
α -Glutamyl	-	100 (e)
γ -Glutamyl	-	100 (e, h)
Acetylglycyl	-	0 (e)
Fruktosyl	-	0 (g, l)
Cyclohexyl	-	0 (k)
Piperidyl	-	0 (k)
Acetyllysin-hydroxyanalog	OH Analog	0 (l)

a = (61)	e = (100)	i = (170)
b = (111)	f = (152)	k = (16)
c = (110)	g = (169)	l = (48)
d = (21)	h = (154)	

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, in denen festgestellt werden sollte, auf welche Weise und in welchem Umfang α - und ξ -Fruktoselysin, zwei wichtige Zwischenprodukte, die bei der Umsetzung von Lysin mit Glukose oder Galaktose im Initialstadium der Maillard-Kondensation entstehen, vom Körper aus dem Darmlumen aufgenommen werden. Weiterhin wurde untersucht, ob ξ -Fruktoselysin sowie ξ -N-Acetyllysin und die Methioninderivate Methioninhydroxyanalog und Acetylmethionin-calcium einen Einfluß auf die Resorption von L-Lysin bzw. L-Threonin ausüben.

3.1 Material und Methoden

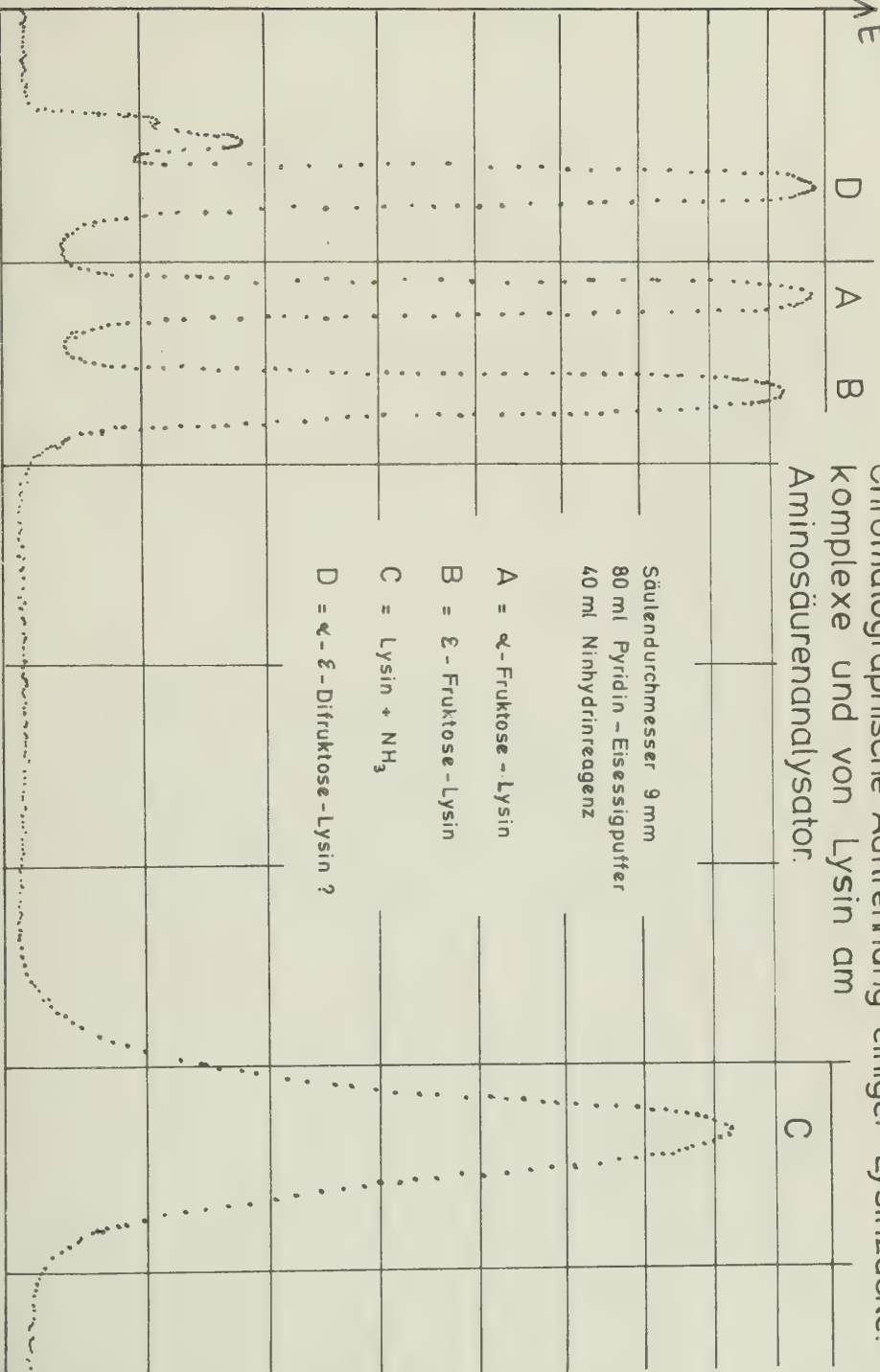
3.1.1 Untersuchungsmaterial

Die zur Durchführung der Versuche notwendigen Proben α - und ξ -Fruktoselysin wurden im Labor hergestellt. Wenn man reines L-Lysin mit Glukose erhitzt, dann entstehen zahlreiche Reaktionsprodukte. Die wichtigsten davon sind α -Fruktoselysin, ξ -Fruktoselysin, α - ξ -Di-fruktoselysin und in geringer Konzentration die entsprechenden Glukoselysine. Abbildung 1 zeigt die chromatographische Auftrennung einiger Lysin-Zuckerkomplexe am Aminosäurenanalysator. Wie man sieht, läßt sich das α -Fruktoselysin gut vom ξ -Fruktoselysin abtrennen. Für die präparative Darstellung von α - und ξ -Fruktoselysin wurde jedoch versucht, nur eine der beiden Verbindungen mit vergleichend hoher Ausbeute zu erhalten.

Chromatographische Auftrennung einiger Lysinzucker- komplexe und von Lysin am Aminosäureanalysator.

Säulendurchmesser 9 mm
80 ml Pyridin - Eisessigpuffer
40 ml Ninhydrinreagenz

A = α -Fructose - Lysin
B = ϵ -Fructose - Lysin
C = Lysin + NH_3
D = α - ϵ -Difructose - Lysin ?

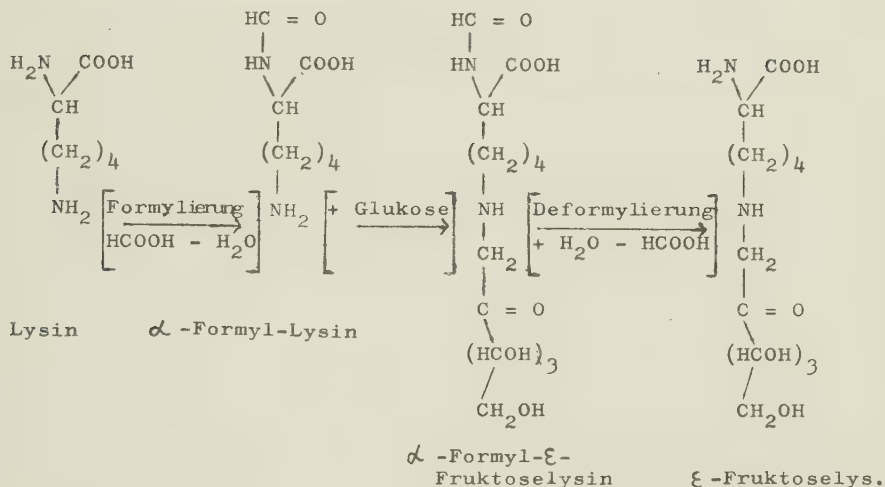


Zur Herstellung des ξ -Fructoselysins wurden 500 mg L-Lysin-HCL bzw. zum Teil ^{14}C markiertes Lysinmonohydrochlorid¹⁾ über eine Anionenaustauschersäule²⁾ geschickt, um chloridfreies Lysin zu erhalten. Das Eluat aus der Säule wurde in ca. 10 ml einer 98%igen Ameisensäure aufgefangen. Dabei ging das Lysin in Lysinformat über. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 50° C auf 2 - 3 ml eingeeengt. Danach wurden noch einmal 5 ml 98%ige Ameisensäure zugesetzt und unter ständigem Rühren im Eisbad 3 ml Essigsäureanhydrid tropfenweise zugesetzt. Dabei entsteht aus dem Lysinformat unter Wasserabspaltung α -Formyllysin. Nach einstündigem Rühren bei Zimmertemperatur wurde mit 20 ml Eiswasser verdünnt. Anschließend wurde die Lösung nochmals am Rotationsverdampfer eingedampft. Aus der entstehenden öligen Flüssigkeit wurde mit Hilfe von Äthyl-Alkohol α -Formyl-Lysin ausgefällt. Diese Ameisensäure-Lysinverbindung wurde anschließend nach Zugabe von Glukose vier Stunden lang in methanolischer Lösung am Rückflußkühler bei Siedetemperatur des Methanols gekocht. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erfolgte die Deformylierung durch schonende Hydrolyse mit 2 N Salzsäure für fünfzehn Minuten im Wasserbad bei Siedetemperatur des Wassers. Danach wurden die Chlorid-Ionen wieder über eine Anionenaustauschersäule²⁾ entfernt. Das erhaltene Eluat wurde schonend eingedampft und in Pyridin-Acetat-Puffer aufgenommen.

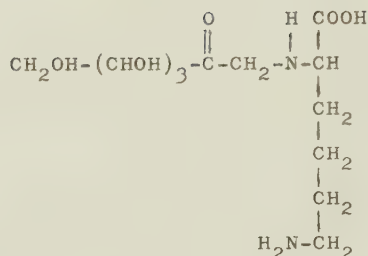
1) Radio Chemical Centre Amersham, England

2) Aberlite JR4B

Reaktionsschema nach FINOT (50)



Die Herstellung des α -Fruktoselysins erfolgte über N- ξ -Formyl-Lysin. Da die α -Aminogruppe wesentlich schneller als die ξ -Aminogruppe mit Ameisensäure reagiert, mußte sie zunächst durch einen Kupfer-Chelat-Komplex blockiert werden. Dieser Chelat-Komplex wurde dann in einer Mischung aus gleichen Volumenanteilen an Methanol mit 1 N Natronlauge gelöst, anschließend im Eisbad abgekühlt und mit Äthylformiat versetzt. Der pH-Wert wurde während der Reaktion mit 5 N Natronlauge auf pH 8-9 eingestellt. Nach zweistündigem Rühren im Eisbad wurden die organischen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgedampft, wobei der Kupferkomplex des N- ξ -Formyl-Lysins ausfiel. Die Kristalle wurden abzentrifugiert und in Wasser suspendiert. Nach Einleiten von Schwefelwasserstoff fiel Kupfersulfid aus, das durch Filtration entfernt wurde. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingeeengt. Anschließend wurde das N- ξ -Formyl-Lysin mit absolutem Alkohol ausgefällt.



α -Fructose-Lysin

Die auf diese Weise gewonnenen Lösungen, die überwiegend α - bzw. ξ -Fruktoselysin enthielten, wurden anschließend durch präparative Ionenaustauschchromatographie mit einem Aminosäurenanalysator¹⁾ weiter gereinigt (Abb. 1). Die Ionenaustauschersäule war 28 cm lang, der Durchmesser betrug 19 mm, die Betriebstemperatur 55° Celsius. Die Durchflußmenge war 180 ml Puffer (Pyridin: Eisessig im Verhältnis von ca. 99 g : 157 g in 5 Liter Wasser; pH-Wert der Pufferlösung = pH 4,35). Die einzelnen Eluatfraktionen (à 10 ml) wurden anschließend auf ihren Gehalt an aminosäurehaltigen Substanzen überprüft. Dazu wurde 1 ml der Fraktion mit 1 ml Ninhydrinreagens im Reagenzglas vermischt und 30 Minuten gekocht, worauf die entscheidenden Fraktionen an ihrer Blaufärbung infolge der Ninhydrinreaktion zu erkennen waren. Um sicher zu gehen, daß es sich bei den ninhydrinpositiven Fraktionen tatsächlich um reines α - oder ξ -Fruktoselysin handelt, erfolgte anschließend die Überprüfung zahlreicher Stichproben durch analytische Ionenaustausch-

1) Modell BC 200 der Firma LKB-Bio-Cal, München

chromatographie. Die als rein erkannten Fraktionen wurden vermischt und zur Beseitigung des Pyridin-Eisessigpuffers, sowie zur Erhöhung der Substratkonzentration gefriergetrocknet. Da Fruktoselysin in Substanz sehr instabil ist, war es nötig, die getrockneten, noch tiefgefrorenen Kristalle gleich wieder in Wasser, das durch einen Tropfen Salzsäure auf pH 2 - 3 gebracht war, zu lösen. Die darauf folgende nochmalige Prüfung des Präparates auf Reinheit, sowie Feststellung des Konzentrationsgehalts der Lösung, erfolgte auf dem Aminosäureanalysator. Als Bezugssubstanz zur Feststellung der Konzentration wurde Norleucin verwendet. Bei allen Präparaten wurden die Konzentrationsangaben auf den Lysinanteil der Verbindung bezogen. Außerdem wurde jede Versuchslösung auf ihre ^{14}C -Aktivität untersucht. Durch Zugabe von H_2O bzw. Krebs-Henseleit Puffer¹⁾ wurden die Lösungen auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -22° Celsius. Um Zersetzungsvorgänge bei den Verbindungen, wie sie bei häufigerem Auftauen der Lösungen eintreten können, zu verhindern, wurden stets kleinere Portionen eingefroren. Bei Bedarf wurde die jeweils benötigte Menge aufgetaut.

Die Überprüfung, ob das verwendete ^{14}C markierte Lysin bzw. Threonin rein war und ob die Radioaktivität vollständig an das Lysin bzw. Threonin gebunden war, wurde ebenfalls mit Hilfe des Aminosäureanalysators durchgeführt. Dazu wurde die Substanz fraktioniert und jede einzelne Fraktion auf Radioaktivität gemessen. Anhand einer vorher angefertigten Eichkurve ließ sich feststellen, ob die Substanz rein war und die Radioaktivität der jeweiligen Aminosäure zugeordnet werden konnte (Abb. 2).

1) Zusammensetzung auf Seite 23

Impuls

Überprüfung der Reinheit von α - und ϵ -Fructose-
lysin nach der Synthese. Das ϵ -Fructoselysin ist nach
vorliegendem Fall unbrauchbar. Techn.Daten wie Abb.1

α -Fructoselysin

ml/min

Impuls

ϵ -Fructoselysin

ml/min

Das ϵ -N-Acetyllysin wurde auf dem Aminosäurenanalysator untersucht, ob es frei von L-Lysin war. Die Analyse ergab einen Lysinanteil von unter 0,5 %. Ebenso wurden die Methioninderivate Acetyl-DL-Methionin-Calcium und Methioninhydroxyanalog auf evtl. vorhandenes L-Methionin untersucht. Beide Verbindungen erwiesen sich ebenfalls als rein.

3.1.2 Untersuchungsmethoden

Für die Versuche wurden erwachsene, männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen bei einer Stalltemperatur von $25 \pm 1^{\circ}$ Celsius und durchgehender Beleuchtung gehalten.

3.1.2.1 In vitro Versuche mit umgestülpten Darmsäcken

Die in vitro Resorptionsstudien wurden an umgestülpten Dünndarmsäcken nach der Methode von WILSON und WISEMAN (137, 158) durchgeführt.

Als Inkubationslösung für die Versuche diente Krebs-Henseleit-Bikarbonatpuffer (82), in dem die für die Versuche verwendeten Substanzen gelöst waren.

Tab. 2 Zusammensetzung des Inkubationsmediums

1. NaCl-Lösung	0,9%ig	(0,154 M)	100 Teile
2. KCl-Lösung	1,15%ig	(0,154 M)	4 Teile
3. CaCl_2 -Lösung ¹⁾	0,11 M	-	3 Teile
4. KH_2PO_4 -Lösung	2,11%ig	(0,154 M)	1 Teil
5. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ -Lsg.	3,82%ig	(0,154 M)	1 Teil
6. NaHCO_3 -Lösung ²⁾	1,3 %ig	(0,154 M)	21 Teile

1) 5 ml dieser Lösung verbrauchen bei der Titration 11 ml einer 0,1 n AgNO_3 -Lösung

2) Die NaHCO_3 -Lösung wurde eine Stunde mit CO_2 durchströmt

Vor Gebrauch wurde die Pufferlösung 10 Minuten lang mit einem O_2/CO_2 -Gemisch (95 % : 5 %) begast und daraufhin auf pH 7,35 - 7,40 eingestellt. Da die Fruktoselysine bereits in H_2O gelöst waren, konnte der Puffer nicht in der üblichen Zusammensetzung für diese Versuche verwendet werden. Deshalb brachten wir für diese Versuche zunächst die Lösungen und α - bzw. ξ -Fruktoselysin durch Verdünnen mit Wasser auf die doppelte der von uns gewünschten Konzentration und gaben dann die gleiche Menge eines doppelt konzentrierten Krebs-Henseleit-Puffers hinzu. Dadurch blieben die Eigenschaften des Inkubationsmediums erhalten.

Die Entnahme der für die Untersuchungen erforderlichen Dünndarmsegmente, erfolgte nach Narkotisierung der Tiere mit Equi-Thesin¹⁾, das in einer Menge von 0,6ml/100g Körpergewicht intramuskulär injiziert wurde. Nach Eintritt der Narkose wurde die Bauchhöhle eröffnet und ein ca. 15 cm langes Stück des proximalen Jejunums (distal vom Lig. duodenocolicum) entnommen. Danach wurde das Darmstück kurz in einer mit eisgekühltem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Petrischale abgekühlt. Anschließend wurde in das Darmlumen ein Plastikkatheter eingeführt, der an der Spitze mit dem einen Ende des Darmstücks mittels einer Ligatur fixiert wurde. Das freie Darmende wurde dann über das fixierte Ende gestülpt, sodaß die muköse Seite des Darmes nach außen, die seröse nach innen zu liegen kam. Nun wurde ein Ende des umgestülpten Darmes mit Operationsseide abgebunden, der so entstandene Schlauch mit 1,0 ml des Inkubationsmediums (seröses Medium) gefüllt und das andere Darmende ebenfalls ligiert. Die zumeist 8 cm langen Säckchen wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben, der, wenn nicht anders angegeben, 20 ml des gleichen Inkubationsmediums wie die Lösung im Säckchen enthielt (muköses Medium). Nach einminütiger Begasung mit einem O_2/CO_2 -Gemisch (95 % zu 5 %) wurde der verschlossene Kolben eine Stunde lang in einem Wasserbad (37° Celsius) geschüttelt. Nach Beendigung der einstündigen Inkubation wurde das Darmsäckchen entnommen und entleert. Durch Wägung wurden die Menge des serösen Mediums sowie das Darm-Frischgewicht und nach Trocknung (105° C) das Darmtrockengewicht festgestellt. Durch die Umstülpung des Darmes gelangt die Epithelseite nach außen und wird

1) Jensen Salsbery Laboratories, Division of Richardson Merrel, Inc., Kansas City Mo.

während der Inkubation von dem mit Sauerstoff angereicherten mukösen Medium umspült. Die Füllung des Säckchens hat außerdem eine leichte Dehnung der Darmwand und damit eine Vergrößerung der Oberfläche und Verminderung der Dicke zur Folge. Damit ist eine gute Versorgung der Mukoszellen mit Sauerstoff und die Funktionsfähigkeit des Darmepithels während der Inkubationszeit sichergestellt. Das verhältnismäßig geringe Volumen auf der serösen Seite des Darmsäckchens bewirkt bei einem Nettosubstrat-Transport von der mukösen zur serösen Seite des Säckchens einen starken Konzentrationsanstieg des transportierten Substrats.

Anhand dieses Konzentrationsanstiegs bzw. der auftretenden Konzentrationsunterschiede zwischen serösem und mukösem Medium kann der aktive Transport einer Substanz festgestellt werden, da zunächst auf beiden Seiten des Darmepithels die gleiche Substratkonzentration herrscht. Nach einer gewissen Zeit erhöht sich die Konzentration im Säckcheninnern (seröses Medium), sodaß der aktive Transport dann sogar ein Konzentrationsgefälle überwinden muß.

Als Parameter für den aktiven Transport der untersuchten Substanzen wurden die nach der Inkubation gemessenen Konzentrationsdifferenzen ($s-m$) zwischen dem serösen (s) und mukösen (m) Medium sowie die entsprechenden Konzentrationsgradienten (s/m) herangezogen. Außerdem wurde die Mengenzunahme der Substrate im serösen Kompartiment (Darmsack) und bezogen auf 100mg Darmtrockengewicht berechnet. Diese Parameter wurden als seröser Transfer bezeichnet.

Zusätzlich wurden das Darmaußengewicht und Darmtrockengewicht in mg sowie das Volumen des serösen Mediums nach der Inkubation in ml angegeben.

Die Tabellen mit den Ergebnissen enthalten jeweils die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Zur Überprüfung der Signifikanz der Gruppenunterschiede wurde der t-Test nach STUDENT herangezogen (132).

Zur ^{14}C -Aktivitätsbestimmung wurden vom serösen und mukösen Medium jeweils 0,5 ml entnommen, mit 0,5 ml einer 0,66N Perchlorsäure enteiweißt und anschließend 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert. Jeweils 0,5 ml des Überstands wurden mit 20ml Bray-Szintillatorflüssigkeit (24) versetzt und in Zählfläschchen gefüllt. Die Meßdauer im Flüssigkeitszintillations-spektrometer¹⁾ betrug 10 Minuten.

Tab. 3 Zusammensetzung der Bray-Szintillationslösung

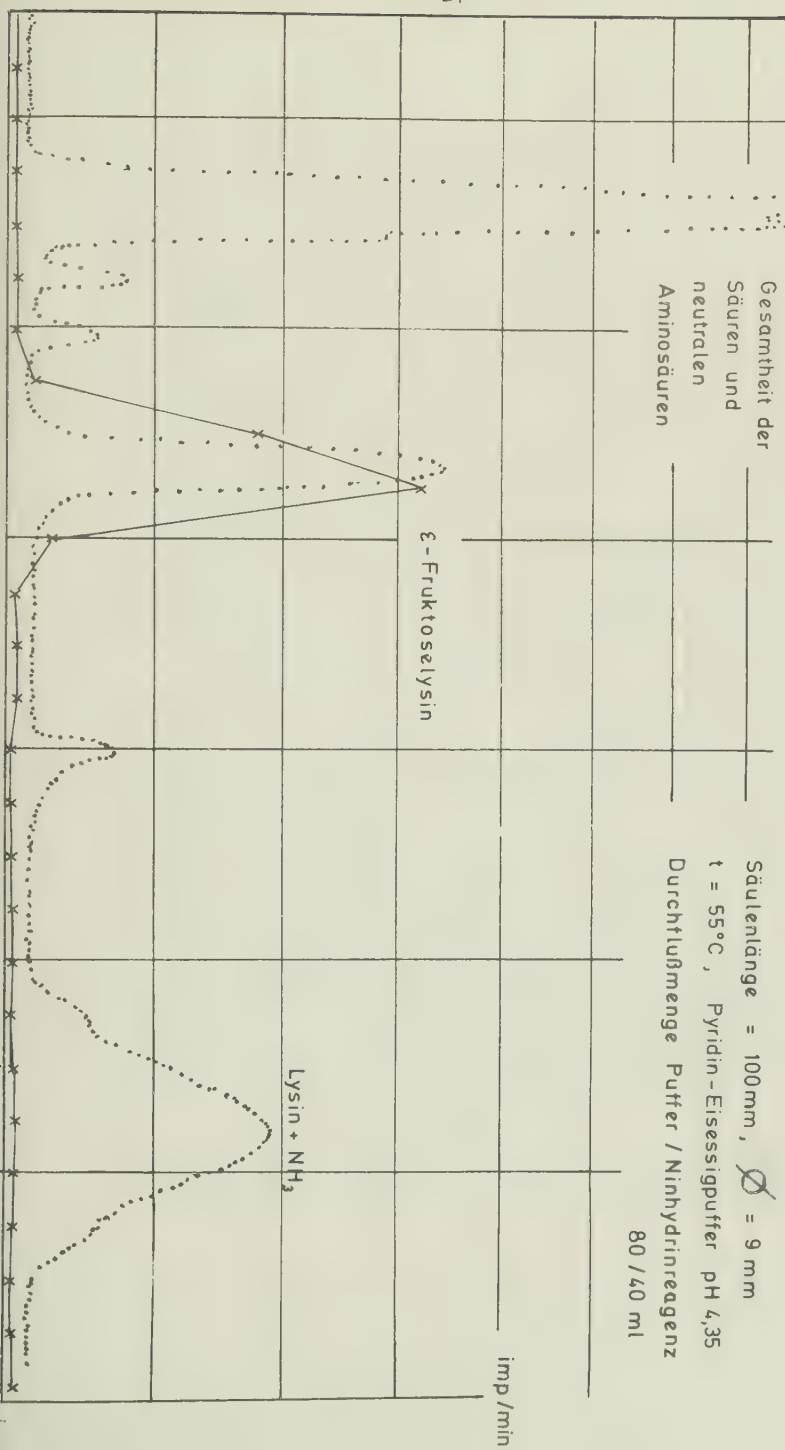
2,5 Diphenoloxazol	4 g
1,4 bis 2 (4 Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol	200 mg
Naphtalin	60 g
Methanol	100 ml
Äthylenglykol	20 ml
Dioxan	ad 1000 ml

Bei der Berechnung der einzelnen Werte wurde die durch den Quench-Effekt verursachte geringere Impulsausbeute berücksichtigt. Der Quench-Effekt wurde mit 0,5 ml ^{14}C markiertem Toluol als innerem Standard ermittelt.

In einem Falle wurde die Inkubationslösung mit ξ -Fruktoselysin (nach zweimaliger Verwendung) chromatographisch überprüft, ob das ξ -Fruktoselysin während des Versuchs zerfallen ist oder abgebaut wurde. Gleichzeitig wurde das Eluat fraktioniert und auf Radioaktivität untersucht. Wie Abb. 3 als Beispiel für ξ -Fruktoselysin zeigt, waren nach dem Versuch in der Inkubationslösung Lysin und verschiedene andere Aminosäuren enthalten. Die Radioaktivität war jedoch nur dem Fruktoselysin zuzuordnen, woraus man schließen kann, daß das ξ -Fruktoselysin nicht zerfallen war. Die nach der Inkubation festgestellten

1) Packard, USA

Gehalt an ϵ -Fructoselysin und Aminosäuren im mucösen Inkubationsmedium nach zweimaliger Verwendung (je 1 Std) sowie die ^{14}C -Aktivität der Eluatfraktionen. (durchgezogene Linie)



Aminosäuren waren damit offensichtlich aus dem Gewebe der Darmwand in die Inkubationsmedien gekommen.

3.1.2.2 In vivo Versuche mit abgebundenen Darmsegmenten

Die in vivo Versuche wurden mit abgebundenen Darmsegmenten durchgeführt (12). Dazu wurden nüchterne, männliche Sprague-Dawley-Ratten mit 0,6ml/100g Körpergewicht Equi-Thesin narkotisiert. Die Tiere des Versuches zur Resorption von α -Fruktoselysin erhielten zur Narkose 15 mg/100g Körpergewicht Inactin¹⁾ intramuskulär verabreicht. Zur besseren Sauerstoffversorgung wurden diese Tiere außerdem bei der 120 Minuten dauernden Versuchszeit in ein Gefäß gebracht, das von einem Sauerstoff-Kohlendioxidgemisch (95 % : 5 %) durchströmt wurde. Nach Eintritt der Narkose wurde die Bauchhöhle eröffnet und das proximale Ende des Jejunums kurz nach dem Übergang vom Duodenum ligiert. Ungefähr 15 cm distal der Ligatur wurde der Darm durch einen kleinen Schnitt geöffnet und die Versuchslösung mittels einer Spritze mit Knopfkanüle in das Darmlumen eingebracht. Dann wurde proximal der Injektionsöffnung abgebunden. Nach provisorischer Schließung der Bauchhöhle wurden die Tiere während der Versuchszeit durch konstante Wärmezufuhr vor der narkosebedingten Unterkühlung geschützt. Bei Versuchsende wurde die Bauchhöhle wieder geöffnet. Zunächst wurden 5ml Blut aus der Pfortader entnommen. Unmittelbar danach wurden die Darmsegmente herauspräpariert, geöffnet und mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf ein Volumen von 10ml durchgespült. Daraufhin wurden die Nieren und die Leber entnommen und der Inhalt der Harnblase mit einer Spritze abgesaugt. Das

1) Promonta, Hamburg

Blut, das durch Zusatz von Heparin und durch Kühlung im Eisbad vor der Gerinnung geschützt worden war, wurde anschließend bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Blutplasma und der Darminhalt wurden durch Zusatz von Trichloressigsäure in 10%iger wässriger Lösung enteiweißt und 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Darmwand sowie die Nieren und die Leber wurden zunächst homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann ebenfalls mit Trichloressigsäure enteiweißt, auf ein einheitliches Volumen von 25ml verdünnt und anschließend zentrifugiert. Jeweils 1ml der enteiweißten Proben wurde zur Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie auf Seite 26 beschrieben. Die im Darm verbliebene Fruktoselysinmenge wurde aus der Differenz der verabreichten Menge zur Aktivität, die nach der Inkubation im Darmlumen und Darmwand wiedergefunden wurde, berechnet.

Das Durchschnittsgewicht der Ratten betrug im Versuch mit ξ -Fruktoselysin 400 g, im Versuch mit α -Fruktoselysin und im Kontrollversuch mit Lysin 230 g. In ein ca. 12 cm langes abgebundenes Darmstück wurden jeweils 2ml der Inkubationslösung verabreicht. Im Kontrollversuch mit Lysin wurden jeweils 1,5ml in das Darmlumen gefüllt. Die Konzentrationen betragen (immer bezogen auf den Lysinanteil) bei ξ -Fruktoselysin 1mM, bei α -Fruktoselysin 0,75mM und bei Lysin 1mM. Die spezifischen Aktivitäten waren bei ξ -Fruktoselysin 59mCi/Mol, bei α -Fruktoselysin 37mCi/Mol und bei Lysin 27mCi/Mol.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 In vivo Resorption von α - und ξ -Fruktoselysin

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und in den Abbildungen dargestellt. Wie schon die früheren Versuche von ERBERSDOBLER (48) zeigten, wurde das als Vergleichssubstanz verwendete L-Lysin rasch aus dem Darmsegment resorbiert. Schon nach 15 Minuten waren 90 % der Aktivität verschwunden, während im Pfortaderplasma nach dieser Zeit die höchste Konzentration an Lysin festzustellen war. Die beiden Fruktoselysine wurden dagegen wesentlich langsamer aus dem Darmlumen aufgenommen, wobei die α -Form schlechter als das ξ -Fruktoselysin resorbiert wurde. Im Harn konnten nur Bruchteile der Ausgangsradioaktivität wiedergefunden werden. Auch die Werte in Niere und Leber waren gering und ohne Unterschied.

Tab. 4 Resorption von L-Lysin sowie von α - und ξ -Fruktoselysin ^{14}C -Aktivität im Darm (Darlumen, Darmwand) und Pfortaderplasma (bezogen auf 10ml Blut) nach verschiedenen Resorptionszeiten. Die unterstrichenen Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$). Die jeweilige Ausgangsdosierung wurde gleich 100 gesetzt

1. <u>L-Lysin</u>	15 Min. (n=5)	30 Min. (n=5)	45 Min. (n=5)
Darminhalt	6,0 $\pm$ 2,7	2,0 $\pm$ 0,63	1,38 $\pm$ 0,44
Darmwand	4,3 $\pm$ 1,9	1,7 $\pm$ 0,31	1,61 $\pm$ 0,40
Darm ges.	10 $\pm$ 4,2	3,7 $\pm$ 0,45	3,0 $\pm$ 0,37
Pfortader-plasma	11 $\pm$ 5,3	3,0 $\pm$ 1,4	2,15 $\pm$ 0,37

2. ξ -Fruktoselysin

	30 Min. (n=5)	45 Min. (n=5)	60 Min. (n=7)	90 Min. (n=7)
Darminhalt	79 $\pm$ 20	64 $\pm$ 19	36 $\pm$ 13	20 $\pm$ 7,1
Darmwand	20 $\pm$ 3,5	30 $\pm$ 14	43 $\pm$ 5,2	33 $\pm$ 5,3
Darm ges.	99 $\pm$ 1,0	94 $\pm$ 6,6	79 $\pm$ 13	53 $\pm$ 16
Pfortader-plasma	0,95 $\pm$ 0,29	2,75 $\pm$ 1,39	7,7 $\pm$ 4,55	9,3 $\pm$ 4,43

3. α -Fruktoselysin

	45 Min. (n=5)	60 Min. (n=5)	90 Min. (n=5)	120 Min. (n=5)
Darminhalt	69 $\pm$ 9,7	51 $\pm$ 14	44 $\pm$ 8,4	41 $\pm$ 19
Darmwand	27 $\pm$ 11	40 $\pm$ 16	44 $\pm$ 17	48 $\pm$ 20
Darm ges.	96 $\pm$ 3,3	91 $\pm$ 7,5	88 $\pm$ 10	89 $\pm$ 13
Pfortader-plasma	Spuren	0,63 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,33	0,93 $\pm$ 0,5

Abb. 4 Intestinale Resorption von Lysin und Fruktoselysin.

^{14}C -Aktivität in Darminhalt $\boxtimes$ und Darmwand $\square$ in Prozent der Ausgangsdosierung.

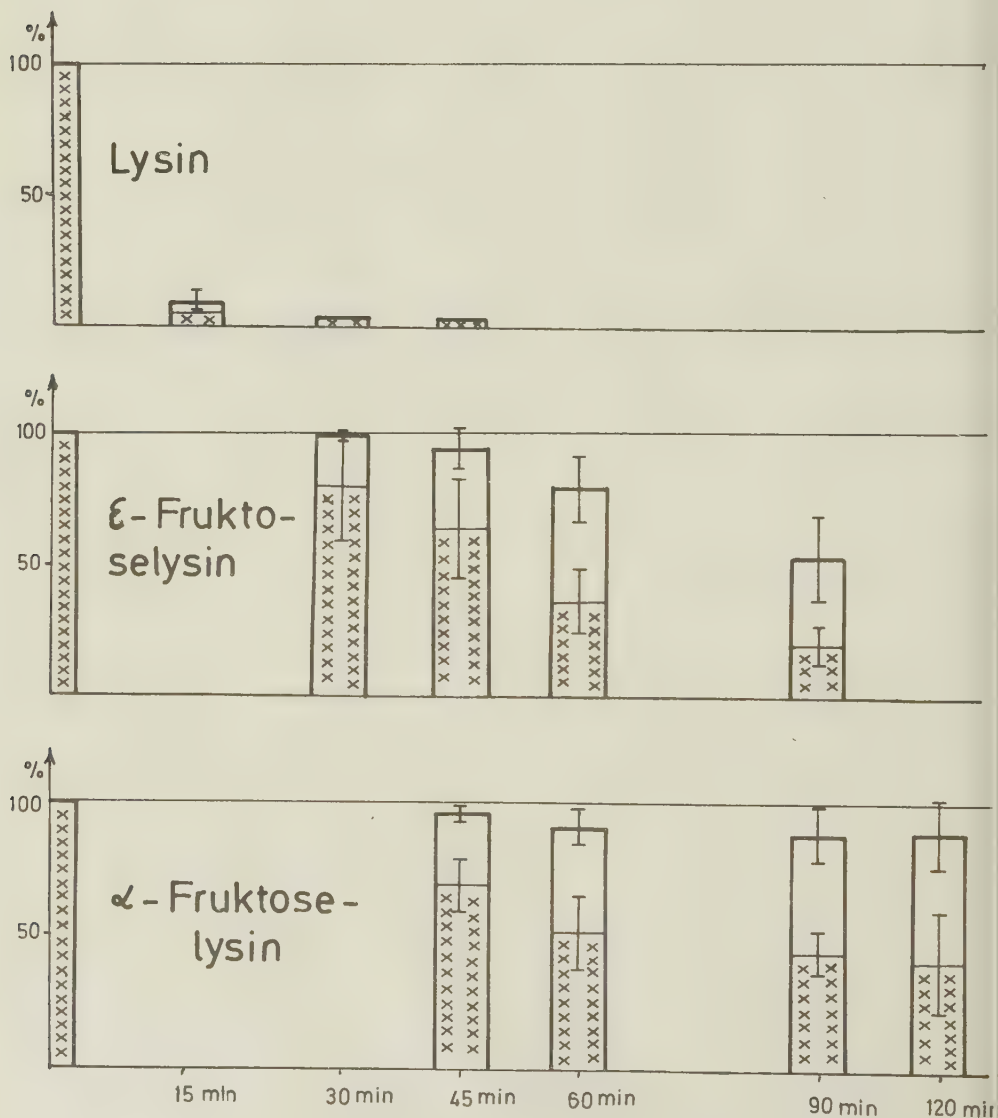


Abb.5 Anzahl der Impulse in Prozent der Ausgangsaktivität in 10 ml Pfortaderplasma.

- 33 -

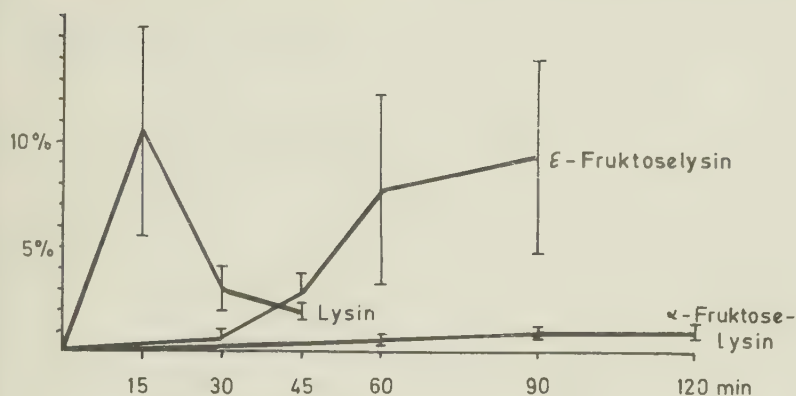


Abb.6 Fruktoselysingehalt in Niere und Leber. Anzahl der Impulse im Homogenat des Gesamtorgans in % der Ausgangsdosierung.

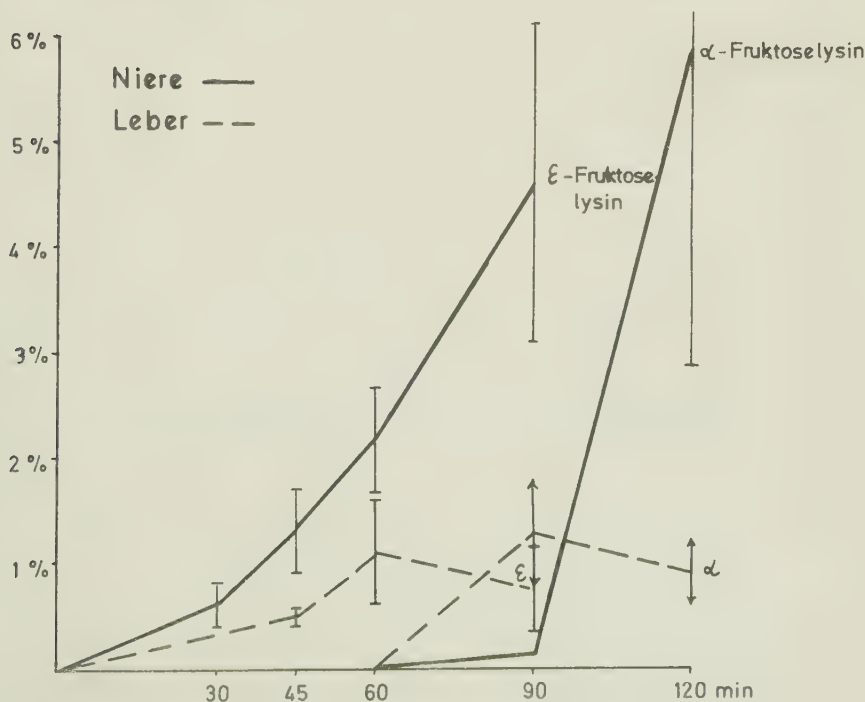
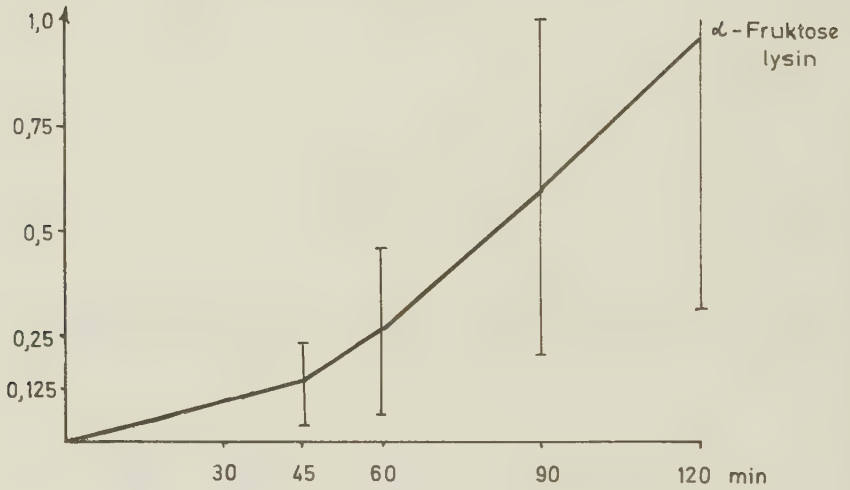


Abb.7 Anzahl der Impulse im Harn in %
der Ausgangsmenge.



3.2.2 In vitro Resorptionsversuche(aktiver Transport)

3.2.2.1 Resorption von ξ -N-Fruktoselysin (ξ -F1)

Wie die vorstehenden Ergebnisse der Resorptionsversuche zeigten, werden α - und ξ -Fruktoselysin vom Körper aufgenommen. Im folgenden Versuch sollte festgestellt werden, ob ξ -Fruktoselysin aktiv vom Darmlumen zur serösen Seite transportiert wird. Die Versuchsanordnung wurde bereits auf Seite 24 beschrieben. Im vorliegenden Versuch betrug das Volumen des mukösen Mediums 15ml. In der Versuchslösung war radioaktiv (^{14}C) markiertes Fruktoselysin (1mM bezogen auf den Lysinanteil) enthalten. Die spezifische Aktivität betrug ca. 56 $\mu\text{Ci/Mol}$. bezogen auf den Lysinanteil. Die Ratten wogen 290 g. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 5. Wie daraus ersichtlich ist, konnte für ξ -Fruktoselysin kein aktiver Transport vom mukösen zum serösen Medium nachgewiesen werden.

Tab. 5 Resorption von ξ -Fruktoselysin in vitro.

ξ -Fruktoselysinkonzentration des mukösen und serösen Mediums sowie seröses Volumen und Darmgewichte (n=9)

	ξ -F1-Konzentration
beide Medien bei Inkubationsbeginn (mM)	1,0
bei Inkubationsende	
im ser. Medium (mM)	$0,74 \pm 0,08$
im muk. Medium (mM)	$1,09 \pm 0,17$
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	501 ± 66
Darmtrockengewicht (mg)	75 ± 11
Vol. des serösen Mediums bei Ink.Ende (ml)	$0,89 \pm 0,05$
s/m Konzentrationsgradient	$0,68 \pm 0,04$

3.2.2.2 Resorption von α -N-Fruktoselysin

In diesem Versuch sollte festgestellt werden, ob α -Fruktoselysin aktiv aus dem Darmlumen transportiert wird.

Das Volumen des mukösen Mediums betrug 16ml. Die Konzentration des ^{14}C -markierten α -Fruktoselysin im Inkubationsmedium war 1mM (bezogen auf den Lysinanteil) bei einer spezifischen Aktivität von 45 $\mu\text{Ci/Mol}$ (bezogen auf den Lysinanteil). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt. Wie bei ϵ -Fruktoselysin konnte auch für α -Fruktoselysin kein aktiver Transport vom mukösen zum serösen Medium nachgewiesen werden.

Tab. 6 Resorption von α -Fruktoselysin in vitro.

α -Fruktoselysinkonzentration des mukösen und serösen Mediums sowie seröses Volumen und Darmgewichte (n=5)

	α -Fruktoselysin- konzentration
beide Medien bei Inkubationsbeginn (mM)	1,0
bei Inkubationsende (mM)	
im ser. Medium	$0,75 \pm 0,08$
im muk. Medium	$1,01 \pm 0,04$
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	584 ± 95
Darmtrockengewicht (mg)	91 ± 13
Vol. des serösen Mediums bei Ink.Ende (ml)	$0,89 \pm 0,08$
s/m Konzentrationsgradient	$0,74$

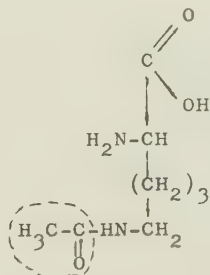
3.2.3 Beeinflussung des Aminosäuretransports durch Aminosäurederivate

Nach Angaben mancher Autoren (28) können einige Peptide die Resorption von Aminosäuren negativ beeinflussen. In den vorliegenden Versuchen sollte überprüft werden, ob diese Theorie für ξ -Fructoselysin und einige andere Aminosäurederivate ebenfalls gilt. Aus diesem Grunde wurden Resorptionsversuche mit Lysin und Threonin bei Zugabe verschiedener Aminosäurederivate durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den entsprechenden Tabellen und in Abb. 8 dargestellt.

3.2.3.1 Beeinflussung der Threoninresorption durch ξ -N-Acetyllysin

Acetyllysin besitzt Lysinwirksamkeit (21, 110, 111). Zunächst sollte festgestellt werden, ob diese Substanz einen Einfluß auf den aktiven Transport von Threonin ausübt, da möglicherweise das Lysin durch die Acetylierung seinen basischen Charakter verliert.

ξ -N-Acetyllysin



Das Volumen des mukösen Mediums betrug 15ml. Die Inkubationslösung enthielt ^{14}C -markiertes L-Threonin in 0,5 mM Konzentration. ξ -N-Acetyllysin war bei der Versuchsgruppe in einer 5mM Konzentration dem Inkubationsmedium zugesetzt. Das Durchschnittsgewicht der Ratten betrug 300 g.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt. Wie daraus hervorgeht, hatte die Anwesenheit von ξ -N-Acetyllysin

einen stimulierenden Einfluß auf den Transport von L-Threonin. Gemessen am Konzentrationsgradienten (serös/mukös) ergab sich eine Transportsteigerung um 51 %. Dieser Wert ist statistisch gesichert. Auch der seröse Transfer erhöhte sich gegenüber dem der Kontrollgruppe, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In einem entsprechenden Vergleichsversuch mit Lysin war weder eine Beschleunigung noch eine Hemmung des Threonintransports zu verzeichnen. Die Ergebnisse dieses Vergleichsversuchs werden in der nachstehenden Tabelle nicht aufgeführt.

Tab. 7 Beeinflussung der Threoninresorption durch ξ -N-Acetyllysin

¹⁴C-Threoninkonzentrationen des mukösen (m) und serösen (s) Mediums sowie seröser Transfer des L-Threonins. Das Inkubationsmedium der Versuchsgruppe enthielt zusätzlich 5mM ξ -N-Acetyllysin

	Kontr. Gruppe (n=7)	Vers. Gruppe (n=13)	signifikant bei
Konzentration des Acetyllysins	-	5mM	
<u>Threoninkonzentrationen:</u>			
bei Inkubationsbeginn (mM)	0,5	0,5	
bei Inkubationsende			
im ser. Medium (mM)	1,7 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,34	n. s.
im muk. Medium (mM)	0,47 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,06	p < 0,01
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	390 $\pm$ 100	310 $\pm$ 130	n. s.
Darmtrockengewicht (mg)	63 $\pm$ 19	56 $\pm$ 8	n. s.
Volumen des serösen Mediums b. Ink.Ende (ml)	0,76 $\pm$ 0,30	0,91 $\pm$ 0,05	n. s.
s-m Konzentrationsdifferenzen für Threonin	1,2 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,4	n. s.
s/m Konzentrationsgradient	3,6 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,8	p < 0,05
ser. Threonintransfer			
(in μ M/Darmsack)	1,0 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,4	n. s.
(in 100mg Darmtrockengewicht)	1,9 $\pm$ 1,40	2,3 $\pm$ 0,70	n. s.

3.2.3.2 Beeinflussung der Lysinresorption durch ξ -N-Acetyllysin

Da Lysin durch die Acetylierung seinen basischen Charakter sicherlich nicht ganz verliert, war auch die Beeinflussung des Lysintransports durch Acetyllysin von Interesse, zumal der vorstehende Versuch für die Threoninresorption keine Hemmwirkung ergeben hatte.

Das Volumen des mukösen Mediums betrug 20ml, die Versuchslösung enthielt ^{14}C markiertes L-Lysin in 0,5 mmolarer Konzentration sowie einen Zusatz von ξ -N-Acetyl-L-Lysin (mM). Das muköse und seröse Medium der Kontrollgruppe war frei von Acetyllysin. Die Ratten wogen 320 - 350 g.

Aus Tabelle 8 geht hervor, daß ξ -N-Acetyl-L-Lysin den Transport von L-Lysin hemmte. Die Transportrate sank gemessen am Konzentrationsgradienten (s/m) signifikant von 100 % der Kontrollgruppe auf 74 %. Nimmt man den serösen Transfer als Bezugsgröße, so fällt die Transporthemmung geringer aus.

Tab. 8 Beeinflussung der Lysinresorption durch Acetyllysin
¹⁴C-Lysinkonzentration des mukösen und serösen
 Mediums sowie seröser Transfer des L-Lysins. Seröses
 Volumen und Darmgewichte. Das Inkubationsmedium der
 Versuchsgruppe enthielt zusätzlich ξ -N-Acetyl-L-
 Lysin (5mM)

	Kontr. Gruppe (n=19)	Vers. Gruppe (n=17)	signifi- kant bei
Acetyllysinkonzentration (mM)	-	5,0	
<u>Lysinkonzentrationen:</u>			
bei Inkubationsbeginn (mM)	0,5	0,5	
bei Inkubationsende			
im ser. Medium (mM)	2,3 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,5	n. s.
im muk. Medium (mM)	0,34 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,03	p < 0,00
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	440 $\pm$ 80	450 $\pm$ 90	n. s.
Darmtrockengewicht (mg)	69 $\pm$ 11	68 $\pm$ 13	n. s.
Volumen des serösen Mediums bei Inkubationsende (ml)	0,94 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,08	n. s.
s-m Konzentrationsdifferenz (mM) für Lysin	2,0 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4	n. s.
s/m Konzentrationsgradient für Lysin	7,0 $\pm$ 2,4	5,2 $\pm$ 1,1	p < 0,00
ser. Lysintransfer			
(in μ M/Darmsack)	1,7 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,4	n. s.
(in μ M/100mg Darmtrocken- gewicht)	2,5 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,6	n. s.

3.2.3.3 Beeinflussung der Threoninresorption durch ξ -Fruktoselysin

Wie die weiter oben beschriebenen Befunde zeigten, konnte für ξ -Fruktoselysin kein aktiver Transport nachgewiesen werden. Möglicherweise wird durch ξ -Fruktoselysin ähnlich wie durch Acetyllysin der Transport anderer Aminosäuren beeinflusst. Die Struktur des ξ -Fruktoselysins wurde auf Seite 19 erörtert.

Das Volumen des mukösen Mediums betrug 15ml; in der Versuchslösung waren ^{14}C -markiertes L-Threonin in 0,1 m-molarer und ξ -Fruktoselysin in 1mM (bezogen auf den Lysinanteil) Konzentration enthalten. Bei der Kontrollgruppe befand sich in serösem und mukösem Medium nur ^{14}C -markiertes Threonin. Die Ratten wogen durchschnittlich 260 g.

Wie sich aus Tabelle 9 ergibt, hatte ξ -Fruktoselysin nur einen geringen Einfluß auf die Threoninresorption. Die Resorptionsrate verringerte sich um 15 %. Dieser Wert ist statistisch nicht gesichert. Bei Anwendung des serösen Transfers als Transportparameter ist ebenfalls nur eine Tendenz in Richtung einer Threoninhemmung festzustellen.

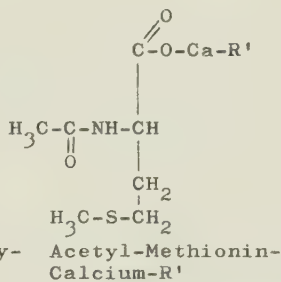
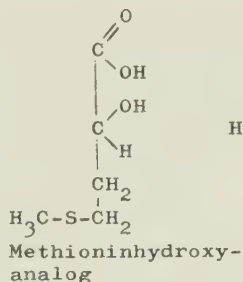
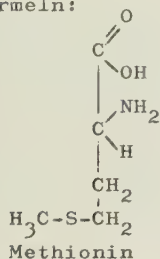
Tab. 9 Beeinflussung der Threoninresorption durch
 ξ -Fruktoselysin
¹⁴C-Threoninkonzentration des mukösen und serösen
 Mediums sowie seröser Transfer des L-Threonins.
 Seröses Volumen und Darmgewichte. Das Inkubations-
 medium der Versuchsgruppe enthielt zusätzlich
 (1,0mM) ξ -N-Fruktoselysin

	Kontr. Gruppe (n=8)	Vers. Gruppe (n=9)	signi- fik. bei
ξ -Fruktoselysinkonzen- tration (mM)	-	1,0	
<u>Threoninkonzentrationen</u>			
bei Inkubationsbeginn (mM)	0,1	0,1	
bei Inkubationsende			
im ser. Medium (mM)	0,275 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,05	n. s.
im muk. Medium (mM)	0,069 $\pm$ 0,01	0,069 $\pm$ 0,00	n. s.
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	585 $\pm$ 144	635 $\pm$ 173	n. s.
Darmtrockengewicht (mg)	91 $\pm$ 20	103 $\pm$ 173	n. s.
seröses Volumen bei Inkubationsende (ml)	0,94 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03	n. s.
s-m Konzentrationsdifferenz (mM)	0,206 $\pm$ 0,035	0,17 $\pm$ 0,03	n. s.
s/m Konzentrationsgradient für Threonin	4,16 $\pm$ 1,48	3,52 $\pm$ 0,83	n. s.
ser. Transfer für Threonin			
(in μ M/Darmsack)	0,168 $\pm$ 0,05	0,137 $\pm$ 0,045	n. s.
(in μ M/100mg Darmtrocken- gewicht)	0,190 $\pm$ 0,08	0,145 $\pm$ 0,068	n. s.

3.2.3.4 Beeinflussung der Lysinresorption durch L-Methionin, Acetyl-Methionin-Calcium und Methioninhydroxyanalog

Aus der Literatur ist bekannt (s. Seite 5), daß der Lysintransport durch L- und DL-Methionin gefördert wird. Dieser Effekt konnte in unserem Labor kürzlich auch in vivo festgestellt werden (38). In diesem Zusammenhang trat die Frage auf, ob verschiedene Methioninderivate ebenfalls diesen positiven Einfluß auf die Lysinresorption ausüben, zumal diese Verbindungen auch eine hohe Methioninwirksamkeit besitzen.

Formeln:



R' = Methionin

Das Volumen des mukösen Mediums betrug stets 20 ml. Die Inkubationslösung der Versuchsgruppen enthielt jeweils ^{14}C -markiertes L-Lysin (1,5mM) und DL-Acetyl-Methionin-Calcium (1,5mM) bzw. Methioninhydroxyanalog (1,5mM) bzw. L-Methionin (1,5mM). Das muköse und seröse Medium der Kontrollgruppe enthielt jeweils nur ^{14}C -markiertes L-Lysin. Die Ratten wogen 300 - 380 g.

Die Ergebnisse der jeweiligen Versuche sind in den nachfolgenden Tabellen 10, 11, 12 zusammengefasst. Die auf Seite 47 angeführte graphische Darstellung (Abb. 8) für die Konzentrationsgradienten zeigt, daß sämtliche in den Versuchen verwendeten Substanzen den Transport des Lysins

stimulierten. Am höchsten war die Resorptionsförderung erwartungsgemäß bei L-Methionin. Das Hydroxyanalog des Methionins förderte Lysin nur mäßig. Allerdings liegt der seröse Transfer, bezogen auf das Darmtrockengewicht, signifikant höher als der entsprechende der Kontrollgruppe. Das DL-Acetyl-Methionin-Calcium zeigte eine eindeutige Stimulierung des Lysintransports. Gemessen am Konzentrationsgradienten stieg die Transportrate um 21 %, gemessen am serösen Transfer um 33 % bzw. 42 %.

Tab. 10 Beeinflussung der Lysinresorption durch L-Methionin ^{14}C -Lysinkonzentration des mukösen und serösen Mediums sowie seröser Transfer des L-Lysins. Seröses Volumen und Darmgewichte. Das Inkubationsmedium der Versuchsgruppen enthielt zusätzlich (1,5mM) L-Methionin

	Kontr. Gruppe (n=4)	Vers. Gruppe (n=4)	signi- fik. bei
L-Methioninkonzentration (mM)	-	1,5	
<u>Lysinkonzentrationen</u>			
bei Inkubationsbeginn (mM)	1,5	1,5	
bei Inkubationsende			
im ser. Medium (mM)	3,55 $\pm$ 0,16	7,28 $\pm$ 0,91	p < 0,01
im muk. Medium (mM)	1,21 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,09	p < 0,05
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	546 $\pm$ 104	533 $\pm$ 52	n. s.
Darmtrockengewicht (mg)	89 $\pm$ 22	83 $\pm$ 10	n. s.
seröses Volumen bei Inkubationsende (ml)	0,82 $\pm$ 0,1	0,89 $\pm$ 0,04	n. s.
s-m Konzentrationsdiff. (mM)	2,33 $\pm$ 0,12	6,22 $\pm$ 0,91	p < 0,01
s/m Konzentrationsgradient für Lysin	2,91 $\pm$ 0,08	7,02 $\pm$ 1,29	p < 0,01
ser. Transfer für Lysin			
(in μM /Darmsack)	1,66 $\pm$ 0,09	5,49 $\pm$ 0,98	p < 0,01
(in μM /100mg Darmtrocken- gewicht)	1,90 $\pm$ 0,42	4,73 $\pm$ 1,94	p < 0,05

Tab. 11 Beeinflussung der Lysinresorption durch Methioninhydroxyanalog

¹⁴C-Lysinkonzentration des mukösen und serösen Mediums sowie seröser Transfer des L-Lysins. Seröses Volumen und Darmgewichte. Das Inkubationsmedium der Versuchsgruppe enthielt zusätzlich 1,5 mM/l Methioninhydroxyanalog

	Kontr. Gruppe (n=5)	Vers. Gruppe (n=5)	signi- fik. bei
Methioninhydroxyanalog- konzentration (mM)	--	1,5	
<u>Lysinkonzentrationen</u>			
bei Inkubationsbeginn (mM)	1,5	1,5	
bei Inkubationsende			
im ser. Medium (mM)	3,92 ± 0,37	4,30 ± 0,61	n. s.
im muk. Medium (mM)	1,26 ± 0,07	1,33 ± 0,05	n. s.
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	468 ± 42	445 ± 102	n. s.
Darmtrockengewicht (mg)	89 ± 14	74 ± 15	n. s.
Volumen des ser. Mediums bei Inkubationsende (ml)	0,91 ± 0,05	0,99 ± 0,05	p < 0,05
s-m Konzentrationsdiff. (mM)	2,66 ± 0,43	2,97 ± 0,66	n. s.
s/m Konzentrationsgradient für Lysin	3,13 ± 0,43	3,26 ± 0,59	n. s.
ser. Transfer für Lysin			
(in µM/Darmsack)	2,20 ± 0,39	2,76 ± 0,56	n. s.
(in µM/100 mg Darmtrocken- gewicht)	2,52 ± 0,6	3,72 ± 0,49	p < 0,05

Tab. 12 Beeinflussung der Lysinresorption durch Acetyl-Methionin-Calcium

Lysinkonzentration des mukösen (m) und serösen (s) Mediums sowie seröser Transfer des L-Lysins. Seröses Volumen und Darmgewichte. Das Inkubationsmedium der Volumengruppen enthielt zusätzlich (1,5mM) Acetyl-Methionin-Calcium.

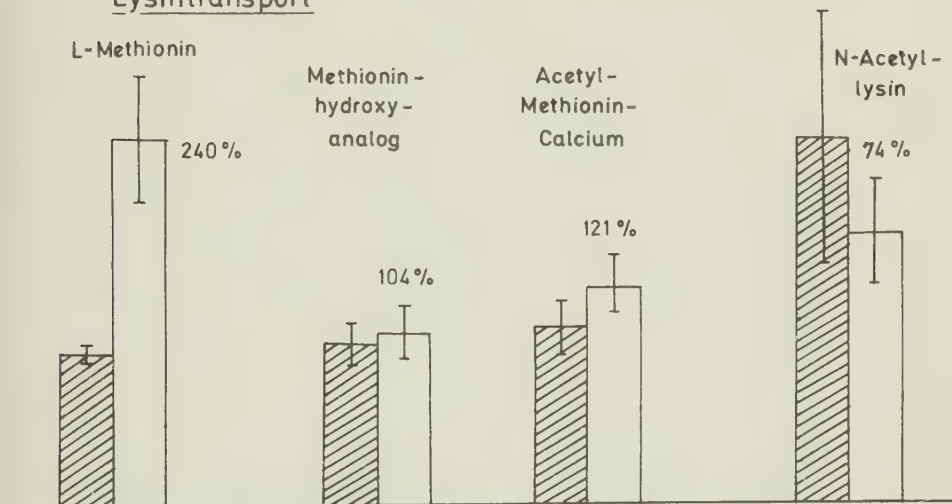
	Kontr. Gruppe (n=10)	Vers. Gruppe (n=10)	signi- fik. bei
Acetyl-Methionin-Calcium konzentration (mM)	-	1,5	
Lysinkonzentration bei Inkubationsbeginn (mM)	1,5	1,5	
bei Inkubationsende			
im ser. Medium (mM)	4,26 ± 0,6	5,17 ± 0,41	p < 0,01
im muk. Medium (mM)	1,25 ± 0,07	1,27 ± 0,13	n. s.
Naßgewicht der entleerten Därme (mg)	440 ± 64	425 ± 71	n. s.
Darmtrockengewicht (mg)	82 ± 17	76 ± 15	n. s.
Volumen des ser. Mediums bei Inkubationsende (ml)	0,93 ± 0,05	0,93 ± 0,04	n. s.
s-m Konzentrationsdiff. (mM)	3,02 ± 0,58	3,91 ± 0,49	p < 0,01
s/m Konzentrationsgradient für Lysin	3,42 ± 0,47	4,14 ± 0,65	p < 0,05
ser. Transfer für Lysin (in µM/Darmsack)	2,57 ± 0,54	3,42 ± 0,44	p < 0,01
(in µM/100 mg Darmtrocken- gewicht)	3,30 ± 1,15	4,68 ± 1,17	p < 0,05

Abb.8 Beeinflussung des aktiven Transports von Lysin und Threonin durch einige Aminosäurenderivate. (Konzentrationsgradienten zwischen serösem und mucösem Medium.)

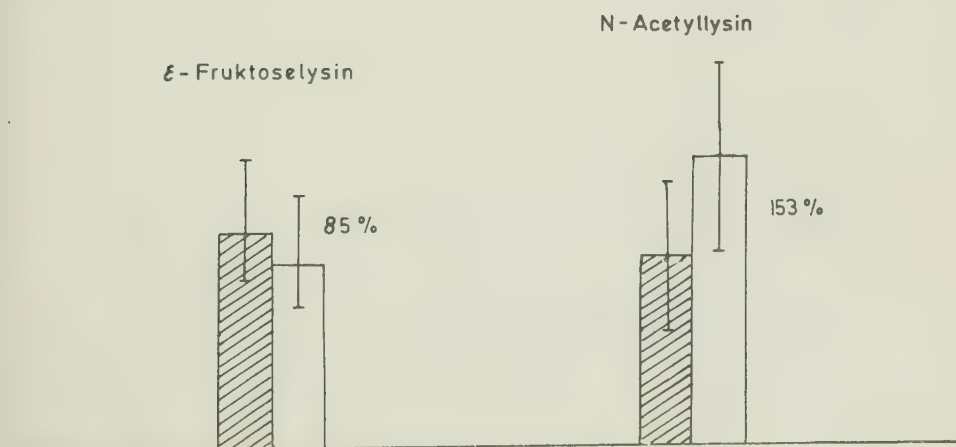
▨ = Kontrolle (100%)

□ = Versuch (%)

Lysintransport



Threonintransport



4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

4.1 Material

Die zur Durchführung der Versuche notwendigen Substanzen α - und ξ -Fruktoselysin wurden in unserem Labor hergestellt. Im Vergleich zu anderen Herstellungsverfahren ist das von uns angewandte Syntheseverfahren (s. Seite 16) recht kompliziert. ERBERSDOBLER (171) ließ in früheren Versuchen eine Mischung aus Lysin und Glukose unter Hitzeeinwirkung reagieren. Dabei war die Ausbeute an Fruktoselysinen nur gering. Es entstanden außerdem α - ξ - Difruktoselysin und bestimmte Bräunungsprodukte in nicht unerheblichen Anteilen. Für die vorliegenden Versuche wurde daher die von FINOT und MAURON (52) beschriebene Arbeitsweise, die eine höhere Ausbeute und eine größere Reinheit der gewünschten Syntheseprodukte ermöglichte, angewandt.

Trotzdem gelang es nicht, bei jeder Synthese eine optimale Reinheit und Ausbeute zu erzielen. Dies lag vermutlich daran, daß nur relativ geringe Mengen zur Synthese der radioaktiv markierten Verbindungen eingesetzt werden konnten.

Für die Aussagekraft der Versuche ist es aber von entscheidender Bedeutung, daß die verwendeten Substanzen frei von Verunreinigungen sind. Auch geringe Reste von Lösungsmitteln können unter Umständen auf die Gewebezellen toxisch wirken oder etwa den Ionen-Haushalt im Versuchsmedium verändern. Bei Versuchen mit radioaktiv-markierten Substanzen ist es besonders wichtig, daß keine andere radioaktive Verbindung das Ergebnis beeinflusst. So war es bei der Synthese unbedingt notwendig, α - und ξ -Fruktoselysin exakt voneinander zu trennen und außerdem den Restanteil

an Lysin völlig abzuscheiden. Dafür wurde das bereits beschriebene (s. Seite 16) präparative Trennverfahren angewandt. Auf diese Weise wurde es möglich, stets mit absolut reinem Material zu arbeiten. Die anschließende Gefrieretrocknung der Substanzen befreite diese schließlich vom Lösungsmittel.

Für die Kontrolle der Reinheit und zur Identifizierung der Verbindungen sowie zur Feststellung der Konzentration der Gebrauchslösungen bzw. für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde ebenfalls die Ionenaustauschchromatographie an Stelle der von FINOT und MAURON (52) beschriebenen Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese herangezogen. Da sich bei den gewählten chromatographischen Bedingungen im Gegensatz zu den Angaben von FINOT (53) das α -Fruktoselysin gut vom ξ -Fruktoselysin abtrennen ließ, war dies die eleganteste und schnellste Methode.

4.2 Beurteilung der Versuchsmethoden

Die "everted sac"-Methode (137, 158) hat sich in den vergangenen Jahren in vielen Resorptionsversuchen bewährt. Sie gewährleistet verhältnismäßig natürliche Versuchsbedingungen und ist unkompliziert in der Handhabung. Zudem ist sie geeignet zum Nachweis eines aktiven Transportes, da man auf beiden Seiten der Darmwand gleiche Konzentrationen herstellen kann.

Gleichzeitig sollte aber auch festgestellt werden, ob die Fruktoselysine überhaupt - das heißt wenigstens durch Diffusion - aufgenommen werden können. Dazu wurden "in vivo Versuche" mit abgebundenen Darmsegmenten (12) durchgeführt. Diese Methode ist zwar unkompliziert, ihre Möglichkeiten sind jedoch begrenzt.

Mit dieser Methode läßt sich nicht feststellen, ob die Resorption durch aktiven Transport oder nur durch passive Diffusion erfolgt, da die zu untersuchende Verbindung in das Lumen und damit nur auf eine Seite der Darmwand ein-

gebracht werden kann. Auch wird bei dieser Methode die Transportrate eines zu resorbierenden Stoffes von mehreren methodisch nicht vermeidbaren Faktoren beeinflusst. So hat die Tiefe der Narkose, die sich für jedes einzelne Versuchstier nur unvollkommen individuell und exakt steuern läßt, eine große Wirkung auf die Durchblutung des Darmes und damit auf die Menge der transportierten Stoffe. Zudem sinkt in tiefer Narkose die Körpertemperatur um einige Grade ab, wodurch eine Verlangsamung der Transportmechanismen eintreten kann. Durch konstante Wärmezufuhr, wie sie bei unseren Versuchen zur Anwendung kam, wurde jedoch einer zu starken Temperatursenkung vorgebeugt.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor, der einen Einfluß auf die Resorptionsrate ausüben kann, ist die Schwierigkeit der genauen Bemessung der Darmlänge. Läßt sich bei der "everted sac" Technik der Darm noch mehr oder weniger genau in seiner Länge bemessen, so ist dies unter in vivo Bedingungen nur unzureichend möglich, da ja der körperwarme Darm von ständigen Kontraktionswellen durchlaufen wird. Es leuchtet ein, daß ein längeres Darmstück mit einer größeren Mukosaoberfläche rascher resorbiert als ein kürzerer Darmabschnitt.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Aktiver Transport: In unseren Versuchen sollte zunächst festgestellt werden, ob α - und ξ -Fruktoselysin in reiner, nicht proteingebundener Form vom Körper aufgenommen werden und ob diese Verbindungen aktiv transportiert werden. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, werden weder das α -Fruktoselysin noch das ξ -Fruktoselysin aktiv transportiert. Die verringerte Konzentration im serösen Medium scheint sogar für einen umgekehrten Transport von der serösen zur mukösen Seite hin zu sprechen. Ein Transport in umgekehrter Richtung wäre durchaus möglich. In der Niere konnte z. B. für L-Glukose ein Transport von der Tubuluszelle in das Lumen hinein festgestellt werden (173). Die verringerte Konzentration im serösen Medium läßt sich jedoch auch damit erklären, daß die Zellen des Darmes einen Teil der Substanzen bis

zu einem Konzentrationsgleichgewicht in sich aufnehmen, obwohl kein aktiver Transport stattfindet. Fruktoselysine kommen ja in der Zelle bei normaler Fütterung nicht vor, so daß hier ein starkes Konzentrationsgefälle zum Zellinnern vorhanden ist. Die Stoffmitnahmen aufgrund der Reibung der Moleküle bei einem erhöhten Wassertransfer von der serösen zur mukösen Seite - sogenannter "solvent drag" (6,54) - und die dadurch bedingte Verdünnung des gleichzeitig verringerten serösen Volumens ist ebenfalls möglich.

4.3.2 Resorption in vivo: Wie schon ERBERSDOBLER (48), FINOT (50) sowie FORD und SHORROCK (55) nachwiesen, kann

ξ -Fruktoselysin dennoch vom Organismus aufgenommen werden. Auch in den vorliegenden Versuchen konnte eine Aufnahme des ξ -Fruktoselysins festgestellt werden. Im Vergleich zu Lysin erfolgte sie allerdings wesentlich langsamer. Der Übertritt vom Darmlumen in die Blutbahn erfolgt offensichtlich per Diffusion. Bemerkenswert ist, daß ein Großteil sowohl des ξ - als auch des δ -Fruktoselysins in der Darmwand wiedergefunden wurde (s. auch unter 4.3.4). Es war zunächst auch nicht ganz auszuschließen, daß die Verbindung während des Versuches teilweise zerfallen war. Das dabei freiwerdende radioaktive Lysin würde die Versuchsergebnisse verfälschen. Allerdings war für das ξ -Fruktoselysin nach zweimaliger Inkubation kein Abbau oder Zerfall nachzuweisen (s. Seite 26). Auch die Versuche von FINOT (50) und FORD (55), wonach bei Verfütterung von ξ -Fruktoselysin große Anteile im Harn wiedergefunden wurden, sprechen für die Aufnahme des intakten Moleküls.

Die δ -Form des Fruktoselysins wird in noch geringerem Maße resorbiert. Beim δ -Fruktoselysin ist eine Lysinresorption nach Aufspaltung der Verbindung während der Inkubationszeit eher möglich als beim ξ -Fruktoselysin. Die hergestellten Präparationen des δ -Fruktoselysins erwiesen sich auch in Lösung bei pH 2 - 3 und bei kühler Lagerung als weniger gut haltbar als das ξ -Fruktoselysin.

Obwohl die Darmsegmente im oberen Jejunum angelegt werden, ist eine Spaltung durch aus dem Blinddarm hochgewanderter Mikroorganismen in Einzelfällen nicht auszuschließen. Bei der Ratte sind unter normalen Umständen auch infolge der Koprophagie manchmal im gesamten Intestinaltrakt Mikroorganismen nachzuweisen. Die Mikroorganismen sind befähigt, ξ -Fruktoselysin (44, 64, 151), Fruktose-L-Tryptophan (133) und sicherlich auch δ -Fruktoselysin abzubauen.

4.3.3 Werte in Leber, Niere und Harn: Das Ausscheidungsverhalten der beiden Fruktoselysine konnte nicht endgültig geklärt werden. VALLE-RIESTRA und BARNES (151) fanden bei Fütterungsversuchen mit hitzegeschädigtem Eialbumin, dessen Lysinanteile radioaktiv markiert waren, einen Teil der Aktivität im Harn wieder (ca. 3 %). Auch FORD und SHORROCK (55) fanden nach Fütterung von hitzegeschädigtem Milchprotein, das größere Mengen an Fruktoselysin enthielt, etwa 3 % des Ausgangsgehalts an Fruktoselysin im Harn wieder. MAURON (100) berichtet von "erheblichen Konzentrationen" an ξ -Fruktoselysin im Harn nach Fütterung von reinem, freiem Fruktoselysin. Er vermutet, daß die Verbindung resorbiert und ausschließlich über den Harn ausgeschieden wird. FINOT (50) fand bei seinen Versuchen 60 - 70 % des verfütterten freien ξ -Fruktoselysins im Urin wieder.

In den vorliegenden Versuchen konnte dagegen nur eine geringe Radioaktivität im Urin festgestellt werden. Lediglich bei den Untersuchungen mit δ -Fruktoselysin gelang es nach zwei Stunden, ca. 1 % der Ausgangsaktivität im Harn wiederzufinden. Man muß jedoch bedenken, daß über das Darmsegment nur sehr wenig Fruktoselysin inkorporiert wurde, das sich sicherlich zunächst in die verschiedenen Flüssigkeitsräume verteilte. Die Konzentrationen im Plasma waren ja nachgewiesenermaßen äußerst gering. Es konnten daher auch 1,5

bzw. 2 Stunden nach der Applikation keine sehr großen Mengen an Fruktoselysin im Harn erwartet wurden. In völlig anders angelegten Versuchen von ERBERSDOBLER und Mitarbeitern (171) wurden trächtigen Merschweinen größere Mengen an ^{14}C - ξ -Fruktoselysin intravenös verabreicht. Dabei wurde unter anderem festgestellt, daß 2 Stunden nach der Injektion 20 - 30 % des ξ -Fruktoselysins im Harn ausgeschieden waren. Bei ähnlich angelegten Versuchen mit Ratten waren 6 Stunden nach der intravenösen Injektion über 60 % und nach 12 Stunden ca. 80 % des ξ -Fruktoselysins im Harn erschienen (171).

Die in der Leber gefundene Aktivität war vermutlich auf das hindurchfließende Portalblut zurückzuführen. Aus der graphischen Darstellung wird ersichtlich, daß die Anzahl der Impulse in der Leber synchron mit der Aktivität im Pfortaderplasma zunahm. In der Niere lagen andere Verhältnisse vor. Beim Lysin waren trotz des starken Anstiegs der Impulse im Pfortaderplasma nach 15 Minuten nur äußerst geringe und nicht unterschiedliche Mengen zu bemerken. Das Lysin wird ja auch in der Niere rückresorbiert und nicht ausgeschieden (167). Beim α -Fruktoselysin und beim ξ -Fruktoselysin dagegen wurde ein langsames aber stetiges Ansteigen der Impulse im Homogenat des Nierengewebes festgestellt. Besonders bei der α -Form war der Anstieg bemerkenswert, da die Harnaktivität nicht im selben Verhältnis zunahm. Es wäre denkbar, daß beide Fruktoselysine möglicherweise verzögert über die Niere ausgeschieden werden, da sie an sauren Gruppen der Mucoproteinketten bzw. der Lipidmembranen des Bürstensaumes festgehalten werden (172). Dadurch käme es in ähnlicher Weise wie an der Darmwand zunächst zu einer Akkumulation in der Niere. Ein Abbau von Fruktoselysin im Stoffwechsel ist in größerem Umfange nicht wahrscheinlich. Wie bereits in Fütterungsversuchen nachgewiesen wurde, besitzt ξ -Fruktose-

keine Lysinwirksamkeit (169). Für ein passives Verhalten des Fruktoselysins im Stoffwechsel sprechen auch die bereits erwähnten Befunde von VALLE-RIESTRA und BARNES (151). Sie untersuchten die Ausatemluft von Ratten auf den Gehalt an $^{14}\text{CO}_2$. Dabei machten sie die Feststellung, daß der Anteil an markiertem CO_2 -Gehalt bei den Tieren, die mit hitzegeschädigtem, sicherlich fruktoselysinhaltigem Eialbumin gefüttert worden waren, erheblich geringer war als bei den Ratten, die das unerhitzte, markierte Albumin erhalten hatten. Allerdings erlauben die Versuche keine quantitative Aussage, da die Hitzeschädigung vermutlich nicht das gesamte markierte Lysin im Eialbumin zerstört hatte.

4.3.4 Beeinflussung der Aminosäurenresorption durch Aminosäurenderivate: Wenn auch die Lysinzuckerkomplexe nach dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen selbst nicht aktiv transportiert werden, so ist doch eine Beeinflussung der Resorption bestimmter Aminosäuren möglich. Die Fruktoselysine waren ja mit zunehmender Dauer der Inkubation vermehrt im Gewebe der Darmwand zu finden. Es ist somit offensichtlich eine Affinität zu bestimmten Bestandteilen der Mukosazelle, vielleicht sogar zu Transportsystemen vorhanden. Auf diese Weise wäre eine kompetitive Behinderung anderer Aminosäuren am Carrier denkbar. Nach ULLRICH (172) lagern sich basische Polypeptide (z. B. Polylysin) an die sauren Gruppen der Lipidschicht der Bürstensaummembran an und bilden einen dichten Molekülfilm, der den Durchtritt von Kationen und damit die Resorption der Aminosäuren behindert. BURACZEWSKY (29) stellte nach Verfütterung hitzegeschädigter Proteine vermehrt Oligopeptide und freie Aminosäuren im Dünndarm fest, während das Pfortaderblut weniger Aminosäuren enthielt. Nach seiner Theorie behinderten größere Mengen unverdaulicher Peptide im Darm die Resorp-

tion der Aminosäuren, weil die Peptide vermutlich die Transportvehikel blockierten. FORD erklärt die Verringerung der Aminosäureaufnahme bei Anwesenheit von Peptiden ebenfalls zum Teil durch die Blockierung der Transportsysteme, hält aber auch eine verminderte Rückresorption der Aminosäuren in der Niere durch resorbierte Peptide für möglich. Es wäre denkbar, daß ϵ -Fruktoselysin als peptidartige Verbindung die Resorption anderer Aminosäuren oder auch anderer Peptide beeinträchtigt.

Durch die Bindung an Fruktose wurde sicherlich der basische Charakter des Lysinanteils verringert. Obwohl noch nicht gesichert ist, ob das Fruktoselysin demnach dem Transportsystem der basischen Aminosäuren oder dem der neutralen Aminosäuren zugeordnet werden muß, wurde zu den vorliegenden Versuchen eine neutrale Aminosäure (Threonin) als Modell für die Hemmungsversuche gewählt. Die Ergebnisse zeigten eine geringgradige Hemmung von Threonin in Gegenwart von Fruktoselysin, die allerdings nicht signifikant war.

Eine Hemmung des Threonintransports wäre auch von ϵ -N-Acetyllysin zu erwarten gewesen, da sich durch die Acetylierung ebenfalls die basischen Eigenschaften verringerten. Wie die Versuche zeigten, trat jedoch eine Förderung der Threoninresorption ein. Die Resorption von Lysin wurde dagegen gehemmt. Das läßt darauf schließen, daß durch die Acetylierung der basische Charakter der blockierten ϵ -Aminogruppe nicht gänzlich verloren ging. ϵ -N-Acetyllysin hat damit, wenn es überhaupt noch aktiv transportiert wird, nach diesen Befunden eine Affinität zum basischen System.

Weitere Untersuchungen wurden zur Beeinflussung der Lysinresorption durch Methioninderivate durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und den Literaturangaben. Sowohl Methionin-Hydroxy-Analog (MHA) als auch Acetyl-Methionin-Calcium (AMC) förderten den aktiven Lysin-

transport. Beide Verbindungen besaßen entweder noch genügend Methionineigenschaften um, wie Methionin selbst (123, 127, 128), die Lysinaufnahme zu beschleunigen oder wurden bereits in der Darmmukosa in Methionin umgewandelt. Nach WHALER (157) kann z. B. N-Acetyl-L-Methionin zum Teil schon innerhalb der Darmwand durch eine Acylase in Methionin umgewandelt werden.

Damit wurde erstmals nachgewiesen, daß auch das ξ -Fruktoselysin - obwohl es noch alle typischen Merkmale einer Aminosäure trägt - nicht mehr durch aktiven Transport resorbiert wird. Eine Aufnahme durch Diffusion ist jedoch möglich, so daß dieses mengenmäßig bedeutsame Zwischenprodukt der Maillardumsetzung in den Organismus gelangen kann. Das α -Fruktoselysin wird kaum aufgenommen, was mit der Blockierung der funktionell wichtigen α -Aminogruppe zusammenhängen dürfte. Besonders interessant ist die hohe Affinität beider Verbindungen zur Darmwand, die eine Blockierung der Aufnahme anderer Aminosäuren möglich erscheinen läßt. Bestimmte Hinweise hierfür ließen sich in der vorliegenden Arbeit bereits aufzeigen. Es bedarf jedoch gesonderter, über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehender und mehr spezifischer Untersuchungen, um diese wichtige Frage endgültig zu klären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen von Untersuchungen über das physiologische Verhalten von Aminosäure-Zuckerkomplexen und anderen Aminosäurederivaten wurden Versuche mit erwachsenen Ratten über die intestinale Resorption von α - und ξ -Fruktoseylsin durchgeführt. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob und inwieweit die Resorption von Aminosäuren durch die Anwesenheit dieser Verbindungen und anderer Derivate beeinflusst wird.

Die Messung der Resorption wurde stets mit ^{14}C -markierten Aminosäuren bzw. Fruktoselysinen durchgeführt. Durch Reaktion von Glukose mit ^{14}C -markiertem Lysin, an dem jeweils die eine oder andere NH_2 -Gruppe durch Formylierung geschützt worden war, wurden α - und ξ -Fruktoselysin hergestellt. Eine präparative Ionenaustauschchromatographie mit Pyridin-Acetat-Puffer und die Gefrier-trocknung der entsprechenden Eluatfraktionen führten zu hochgereinigten Präparaten, die in wässriger Lösung bei pH 2 - 3 stabil waren. Für die Feststellung des aktiven intestinalen Transports wurde die "everted sac" Methode herangezogen. In Versuchen mit abgebundenen Darmsegmenten am narkotisierten Tier wurde weiterhin untersucht, ob die Fruktoselysine die Darmwand überhaupt passieren. Als zusätzliche Untersuchungskriterien wurden die im Pfortaderplasma sowie in Leber, Niere und Harn auftretenden Aktivitäten gemessen.

Wie die Untersuchungen ergaben, werden weder α -Fruktoselysin noch ξ -Fruktoselysin aktiv vom Darmlumen zur serösen Seite transportiert. Eine Aufnahme der Verbindungen durch Diffusion ist dagegen möglich. Die Aufnahme von α -Fruktoselysin geschieht jedoch äußerst langsam. Auch ξ -Fruktoselysin wird verglichen mit L-Lysin verzögert resorbiert. Während L-Lysin schon nach 10 Minuten

zu 90 % aus dem Darmsegment verschwunden war, waren 90 Minuten nach der Inkorporierung 70 % des ξ -Fruktoselysins und 90 % des α -Fruktoselysins noch nicht aufgenommen.

Nach einer gewissen Zeit (60 - 120 Min.) waren große Mengen an Fruktoselysin in oder an der Darmwand gebunden, was auf eine Affinität der Fruktoselysine zu Bestandteilen der Mukosazelle, vielleicht sogar zum Transportsystem schließen läßt.

Das Ausscheidungsverhalten der Verbindungen war bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht exakt zu messen.

Acetyl-Lysin förderte die Resorption von Threonin, hemmte jedoch die Aufnahme von L-Lysin. Diese Ergebnisse sind signifikant ($p < 0,05$). Die geringgradige Hemmung der Threoninresorption durch ξ -Fruktoselysin war nicht signifikant. Methionin, Methioninhydroxyanalog und Acetyl-Methionin-Calcium wirkten sich dagegen deutlich beschleunigend auf die Resorption des Lysins aus.

Damit wurde erstmals nachgewiesen, daß die beiden wichtigsten Lysin-Zuckerkomplexe nicht aktiv resorbiert werden. Das als Zwischenprodukt der "Maillard-Reaktion" von Proteinen mit Glukose besonders bedeutsame ξ -Fruktoselysin kann dagegen durch Diffusion in den Organismus gelangen, was weitere physiologische und toxikologische Untersuchungen notwendig macht. Auch die hohe Affinität der Fruktoselysine zur Darmwand, die eine Behinderung der Resorption anderer Nährstoffe möglich erscheinen läßt, bedarf weiterer Beachtung.

SUMMARY

Intestinal absorption of lysine and fructoselysine.

In experiments with radioactive labeled α - and ξ -fructoselysine on adult rats, the intestinal absorption of these compounds and their influence on the absorption of some aminoacids were tested.

The fructoselysines were synthesized by the reaction of glucose together with U-¹⁴C-lysine, which was protected either at the α - or ξ -amino group by previous formylation. By further preparative ion exchange chromatography with a pyridineacetic acid buffer solution and freeze drying of the fractions highly purified samples were obtained. The lysine-sugar complexes were stable in slightly acidified (pH 2-3) aqueous solution.

For the determination of the active intestinal transport the "everted sac" method was used. The general uptake of the fructoselysines in the intestine was tested using segments of the jejunum of anesthetized rats. Furthermore, the radioactive counts, appearing in the portal vein plasma, the liver, the kidneys and the urine were measured.

The results of the investigations demonstrated clearly that neither α - nor ξ -fructoselysine were actively transported from the mucosal to the serosal side. An absorption of the compounds by diffusion, however, is possible. The uptake of α - and ξ -fructoselysine is, compared with L-lysine, relatively slow. While 90 % of the L-lysine had been disappeared out of the intestinal segments ten minutes after application, about 70 % of the ξ -fructoselysine and 90 % of the α -fructoselysine were not yet absorbed even 90 minutes after incorporation. At this point of time (60 - 120 minutes) the gut wall contained high quantities of fructoselysine, which indicates that there is an affinity to parts of the intestinal wall, perhaps even to the transporting system.

The way of elimination of the compounds could not be measured exactly under the test conditon used.

Acetyllysine favored the absorption of L-lysine. These results are slightly significant. Fructoselysine seemed to hinder the uptake of threonine. The results were not significant. Methionine, Methioninehydroxyanalogue and Acetyl-methionine-calcium, however, acellerated the absorption of the lysine.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADIBI, S. A., S. J. GRAY

Intestinal absorption of essential amino acids in man. Gastroenterology 52, 837, (1967)

2. AGAR, W. T., F. J. R. HIRD, G. S. SIDHU

The active absorption of amino acids by the intestine. J. Physiol. 121, 255, (1954)

3. AGAR, W. T., F. J. R. HIRD, G. S. SIDHU

The absorption, transfer and uptake of amino acids by intestinal tissue. Biochim. Biophys. Acta 22, 21, (1956)

4. AGAR, W. T., F. J. R. HIRD, G. S. SIDHU

The uptake of amino acids by the intestine. Biochim. Biophys. Acta 14, 80, (1954)

5. ALVARADO, F. Transport of sugars and amino acids in the intestine; Evidence for a common carrier. Science 151, 1010, (1966)

6. ANDERSON, B., H. H. USSING

Solvent drag on non electrolytes during osmotic flow through isolated skin and its response to antidiuretic hormone. Acta Physiol. Scand. 39, 228, (1957)

7. ANET, E. F. L. J.

Crystalline di-D-fructoseglycine and some related compounds. Australian J. Chem. 12, 280, (1959)

8. ANET, E. F. L. J., T. M. REYNOLDS

Di-fructose aminoacids as intermediates in browning reactions. Australian J. Chem. 12, 483, (1959)

9. ATKINSON, J., K. J. CARPENTER

Nutritive value of meat meals
I. Possible growth depressant factors. J. Science Food Agriculture 21, 360, (1970)

10. ATKINSON, J., K. J. CARPENTER
Nutritive value of meat meals
II. Influence of raw materials and processing on protein quality.
J. Science Food Agriculture 21, 366, (1970)
11. ATKINSON, J., K. J. CARPENTER
Nutritive value of meat meals
III. Value of meat meals as supplement to a cereal basal diet: Limiting amino acids in these diets.
J. Science Food Agriculture 21, 369, (1970)
12. ATKINSON, R. M., B. J. PARSONS, D. H. SMYTH
The intestinal absorption of glucose.
J. Physiol. 135, 581-589
13. BAKER, R. D., J. M. WALL, S. WATSON, L. J. LONG
Transmural electrical potential across rat jejunum. Effects of eversion and rapid temperature changes.
Biochim. Biophys. Acta 150, 649, (1968)
14. BALDWIN, H. R., C. P. BERG
The influence of optical isomerism and acetylation upon the availability of tryptophan for maintenance in man.
J. Nutrition 32, 203, (1949)
15. BERG, C. P. The availability of D(-)lysine for growth.
J. Nutr. 12, 671, (1936)
16. BERLINGUET, L., L. M. BABINEAU, N. BEGIN, J. DUNNIGAN, F. MARTEL
Preliminary biochemical studies of some ϵ -substituted lysines.
Can. J. Biochem. Physiol. 41, 2373, (1963)
17. BINGHAM, K. J., H. NEWAY, D. H. SMYTH
Interaction of sugars and amino acids in intestinal transfer.
Biochim. Biophys. Acta 130, 281, (1966)
18. BIRD, F. H. A comparison of methionine and two of its analogues in the nutrition of the chick.
Poultry Science 31, 1095, (1952)
19. BIRNBAUM, S. M., L. LEVINTOW, B. KINGSLEY, J. P. GREENSTEIN
Specificity of amino acid acylases.
J. Biol. Chem. 194, 455, (1952)

20. BIRNBAUM, S. M.

"Aminoacylase: Amino acid acylases I and II from hog kidney". In: Methods in enzymology, Vol. II. Academic Press, New York, p. 115, (1955)

21. BJARNASON, J., K. J. CARPENTER

Mechanisms of heat damage in proteins
1. Models with acylated lysine units.
Br. J. Nutr. 23, 859, (1969)

22. BJARNASON, J., K. J. CARPENTER

Mechanisms of heat damage in proteins
2. Chemical changes of pure proteins.
Br. J. Nutr. 24, 313, (1970)

23. BLOCK, R. J., H. H. MITCHEL

The correlation of the amino-acid-composition of proteins with their nutritive value.
Nutr. Abstr. Rev. 16, 249, (1946)

24. BRAY, G. A., A simple liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.

Anal. Biochem. 1, 279, (1960)

25. BRONK, J. R., D. S. PARSON

The influence of thyroid gland on amino acid accumulation and protein synthesis by rat small intestine in vitro.

J. Physiol. 184, 942, (1966)

26. BRÜGGEMANN, J., K. DREPPER, H. ZUCKER

Quantitative Bestimmung der Verwertung von D-L-, DL-Methionin und Ca-DL-2-Hydroxy-4-methylthiobutyrat durch das Hühnerküken.
Naturwiss. 14, 334, (1962)

27. BRÜGGEMANN, J., H. ERBERSDOBLER

Fructoselysin als wichtigstes Reaktionsprodukt von Lysin mit Glucose bei Hitzeschädigung von Lebens- und Futtermitteln.
Zeitschr. Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 137, 137, (1968)

28. BURACZEWSKI, S., J. W. G. PORTER, B. A. ROLLS,
T. ZEBROWSKA

The course of digestion of different food proteins in the rat.
2. The effect of feeding carbohydrate with proteins.
Br. J. Nutr. 25, 299, (1971)

29. BURACZEWSKI, S., L. BURACZEWSKA, J. E. FORD
The influence of heating of fish proteins
on the course of their digestion.
Acta biochem. polon. 14, 121, (1967)
30. CAHILL, W. M., G. G. RUDOLPH
The replacability of DL-methionine in
the diet of the rat with its alpha-keto
acid analogue.
J. Biol. Chem. 145, 201, (1942)
31. CARPENTER, K. J.
Damage to lysine in food processing:
It's measurement and it's significance.
Nutr. Abstr. Revs. 43, 423, (1973)
32. CHRISTENSEN, H. N., H. AKEDO, D. I. OXENDER, C. G. WINTER
Permeability and amino acid transport.
On the mechanism of amino acid transport
into cells. In: "Amino acid pools".
By Holden, J. T. Elsevier Publishing
Company (1962) Amsterdam-London-New York
33. CONRAD, R. M., C. P. BERG
The optical inversion of D-histidine in
the animal body.
J. Biol. Chem. 117, 351, (1937)
34. CRANE, R. K.
Na-dependant transport in intestine and
other tissues.
Federation Proc. 24, 1000, (1965)
35. CURRAN, P. F., S. G. SCHULTZ, R. A. CHEZ, R. E. FUISZ
Kinetic relations of the Na-amino acid
interaction at the mucosal border of
intestine.
J. Gen. Physiol. 50, 1261, (1967)
36. EICHNER, K., M. KAREL
The influence of water content and water
activity on the sugar-amino browning in
model systems under various conditions.
J. Agr. Food Chem., Vol. 20, No. 2
S. 218 (1972)
37. ELDRED, N. R., G. RODNEY
The effect of proteolytic enzymes on raw
and heated casein.
J. Biol. Chem. 162, 261, (1946)

38. ERBERSDOBLER, H., J. GROPP, E. SCHARRER

Zur Methioninwirksamkeit von DL-Acetyl-Methionin-Calcium.
Zeitschr. Tierphysiol. Tierernährg.
Futtermittelkde. 30, 121, (1970)

39. ERBERSDOBLER, H.

Zur Schädigung des Lysins bei der Herstellung und Lagerung von Trockenmilch.
Milchwissenschaft 25, 280, (1970)

40. ERBERSDOBLER, H.

Untersuchungen zur analytischen und physiologischen Charakterisierung der Aminosäurenschädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs- und Futtermitteln.
Habilitationsschrift München (1967)

41. ERBERSDOBLER, H., H. ZUCKER

Untersuchungen zum Gehalt an Lysin und verfügbarem Lysin in Trockenmagermilch.
Milchwissenschaft 21, 564, (1966)

42. ERBERSDOBLER, H.

Die Bestimmung von verfügbarem Lysin in Eiweißfuttermitteln mit Hilfe von Dinisrofluorbenzol.
Med. vet. Diss. München (1963)

43. ERBERSDOBLER, H.

Ergebnisse zur Qualitätsbeurteilung der Trockenmagermilch.
Landw. Forschung 19, 264, (1966)

44. ERBERSDOBLER, H., I. GUNSSER, G. WEBER

Abbau von Fruktoselysin durch die Darmflora.
Zbl. Vet. Med., A, 17, 573, (1970)

45. ERBERSDOBLER, H.

Aminosäuregehalte der Futtermittel und Probleme der Verfügbarkeit.
Deutsche Müllerzeitung Heft 19 (1971)

46. ERBERSDOBLER, H., H. DÜMMER

Untersuchungen zur analytischen physiologischen Charakterisierung der Aminosäureschädigung durch Hitzebehandlung
3. Untersuchungen an einem überhitzten Magermilchpulver.
Zeitschr. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkde. 28, Heft 4, S. 224, (1971)

47. ERBERSDOBLER, H.

Chapter 31, "The normal course of digestion of food proteins".
In: Porter, J. W. G. and Rolls, B. A.
"Proteins in human nutrition".
Academic Press, London, New York (1973)

48. ERBERSDOBLER, H.

Über Untersuchungen zur intestinalen Resorption von ξ -Fruktoselysin.
Zeitschr. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 28, 43, (1971)

49. EVANS, R. J., H. A. BUTTS

Studies on the heat inactivation of lysine in soy bean oil meal.
J. Biol. Chem. 175, 15, (1948)

50. FINOT, P. A.

Chapter 34, "Non-enzymic browning"
In: Porter, J. W. G. and Rolls, B. A.
"Proteins in human nutrition"
Academic Press, London, New York (1973)

51. FINOT, P. A., J. BRICONT, R. VIANI, J. MAURON

Identification of a new lysine derivate obtained upon acid hydrolysis of heated milk.
Experientia 24, 1097, (1968)

52. FINOT, P. A., J. MAURON

Le blocage de la lysine par la reaction de Maillard I. Synthese de N-(desoxy-1-D-fructosyl-1)-et N-(desoxy-1-D-lactulosyl-1)-L-lysines.
Helv. Chim. Acta 52, 1488, (1972)

53. FINOT, P. A. Persönliche Mitteilung

54. FISHER, R. B.

The absorption of water and of small solute molecules from the isolated small intestine of the rat.
J. Physiol. 130, 655, (1955)

55. FORD, J. E., C. SHORROCK

Metabolism of heat-damaged protein in the rat. Influence of heat-damage on the excretion of amino acids and peptides in the urine.

Br. J. Nutr. 26, 311, (1971)

56. FREIMUTH, U., A. TRÜBSBACH

Versuche zur Maillard-Reaktion

1. Untersuchung der Umsetzung von β - Lactoglobulin mit Lactose im "trockenen Zustand".

Nahrung 13, 3, (1969)

57. FRIZZEL, R. A., S. G. SCHULTZ

Effects of monovalent cations on the sodium-alanine interaction in rabbit ileum; implications of anionic groups in sodium binding.

J. Gen. Physiol. 56, 462, (1970)

58. GIBSON, Q. H., G. WISEMAN

Selective absorption of stereo isomers of amino acids from loops of the small intestine of the rat.

Biochem. J. 48, 426, (1951)

59. GITLER, C.

2. Protein digestion and absorption in nonruminants. In: H. N. Munro and J. B. Allison "Mammalian protein metabolism" Academic Press New York-London Vol. I 35-70 (1964)

60. GORDON, R. S., I. W. SIZER

The biological equivalence of methionine hydroxy analogue.

Poultry Science 34, 1198, (1955)

61. GORDON, W. G.

The metabolism of N-methylated amino acids

I. The availability of N-monomethyllysine and α -N-dimethyllysine for growth.

J. Biol. Chem. 127, 487, (1939)

62. GREENSTEIN, J. P., M. WINITZ

"The replaceability of natural, L-amino acids in diets by their D-Antipodes and by various derivatives" in "Chemistry of the amino acids", John Wiley & Sons, Inc. (1961)

63. GREENSTEIN, J. P., L. LEVINTOW, C. G. BAKER,
J. WHITE Preparation of the four stereoisomers
 of isoleucine
 J. Biol. Chem. 188, 647, (1951)
64. GUNSSER, I. Untersuchungen über den Einfluß einer
 Erhitzung von Proteinen auf die Amino-
 säurenverdaulichkeit und biologische
 Wertigkeit.
 Med. vet. Diss. München (1972)
65. HAGAN, S. N., M. J. HORN, S. H. LIPTON, M. WOMACK
 Availability of amino acids. Fructose-
 glycine as a source of nonspecific
 nitrogen for rats.
 J. Agr. Food Chem. 18, 273, (1970)
66. HAGIHIRA, H., E. C. C. LIN, A. H. SAMIY, T. H. WILSON
 Active transport of lysine, ornithine,
 arginine, and cystine by the intestine.
 Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 478, (1961)
67. HAGIHIRA, H., E. C. C. LIN, T. H. WILSON
 Intestinal transport of certain N-sub-
 stituted amino acids.
 Am. J. Physiol. 203, 637, (1962)
68. HANNAN, R. S., C. H. LEA
 Studies of the reaction between proteins
 and reducing sugars in the dry state
 VI. The reactivity of the terminal amino-
 groups of lysine in model systems.
 Biochem. Biophys. Acta 2, 293, (1952)
69. HARTLEY, A. W., L. D. WARD, K. J. CARPENTER
 Hydroxylysine as a growth stimulant in
 microbiological assays for lysine.
 J. Soc. Anal. Chem. 90, 600, (1965)
70. HEYNS, K., H. PAULSEN
 Über die chem. Grundlagen der Maillard-
 Reaktion. Wiss. Veröffentl. der Deutschen
 Gesellschaft für Ernährung.
 "Veränderungen der Nahrung durch industri-
 elle und haushaltsmäßige Verarbeitung",
 Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt,
 (1960), S. 15

71. HEYNS, K., H. PAULSEN, H. SCHROEDER

Die Umsetzung von Keto-hexosen mit sekundären Aminosäuren und sekundären Aminen. Tetrahedon, Pergamon Press Irland 13, 247, (1961)

72. HEYNS, K., H. NOAK

Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin und deren Beziehung zu nichtessentiellen Bräunungsreaktionen. Chem. Ber. 25, 720, (1962)

73. HODGE, J. E. Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. J. Agr. Food Chem. 1, 928, (1953)

74. HODGE, J. E., C. E. RIST

The Amadori Rearrangement under new conditions and its significance for non enzymatic browning reactions. J. Americ. Chem. Soc., 75, 316, (1953)

75. HORN, M. J., H. LICHTENSTEIN, M. WOMACK

Availability of amino acids
A methionine-fructose compound and its availability to microorganisms and rats. J. Agric. Food Chem. 16, 741, (1968)

76. IMAMI, R. H., S. REISER, P. A. CHRISTIANSEN

Effects of vitamin E and essential fatty acid deficiencies on the intestinal transport of L-valine and L-methyl-D-glucoside in the rat. J. Nutr., 100, 101, (1970)

77. JERVIS, E. L., D. H. SMYTH

Competition between enantiomorphs of amino acids during intestinal absorption. J. Physiol. 145, 57, (1959a)

78. JERVIS, E. L., D. H. SMYTH

Relation between concentration and rate of intestinal absorption of D- and L-amino acids. J. Physiol. 147, 44, (1959b)

79. JERVIS, E. L., D. H. SMYTH

The active transfer of D-methionine by the rat intestine in vitro. J. Physiol. 151, 51, (1960)

80. KAREL, M., T. P. LABURA
Enzymatic browning in model systems
containing sucrose,
J. Agr. Food Chem. 16, 717, (1968)
81. KIM, S., L. BENOITON, W. K. PAIK
On the metabolism of ϵ -N-methyl-L-lysine
by rat-kidney homogenate.
Biochim. Biophys. Acta 71, 745, (1963)
82. KREBS, H. A., K. HENSELEIT
Untersuchungen über die Harnstoffbildung
im Tierkörper.
Z. Physiol. Chem. 210, 33, (1932)
83. LARSON, P. R., J. E. ROSS, D. F. TAPLEY
Transport of neutral, dibasic and N-methyl-
substituted amino acids by the rat
intestine.
Biochim. Biophys. Acta 88, 570, (1964)
84. LEA, C. H., R. S. HANNAN
Studies of the reaction between proteins
and reducing sugars in the dry state.
III. Nature of the protein groups reacting.
Biochim. Biophys. Acta 5, 433, (1950)
85. LEA, C. H., D. N. RHODES
Studies on the reaction between proteins
and reducing sugars in the dry state.
V. The reaction of D-galactose, 2-deoxy-
D-galactose, D-glucosamin and N-acetyl-
D-glucosamine with casein.
Biochim. Biophys. Acta 2, 56, (1952)
86. LECLERC, J., L. BENOITON
Further studies on ϵ -lysine acylase.
The ω -N-acyl-diamino acid hydrolase
activity of avian kidney.
Can. J. Biochem. 46, 471, (1968)
87. LERNER, J., S. YANKLOWITZ, M. W. TAYLOR
The intestinal absorption of methionine.
in chickens provided with permanent
Thiry-Vella fistulas.
Experientia 25, 689, (1969)
88. LEWIS, V. M., C. H. LEA
A note on the relative rates of reaction
of several reducing sugars and sugar deri-
vatives with casein.
Biochim. Biophys. Acta 4, 532, (1950)

89. LONDON, D. R., S. SEGAL

In vitro studies on the intestinal transport of amino acids and sugars in hypothyroid rats.
Endocrinology 80, 623, (1967)

90. MACHLIN, L. J., R. S. GORDON

Equivalence of methionine hydroxy analogue and methionine for chickens fed low-protein diets.
Poultry Science 38, 650, (1959)

91. MAILLARD, L. C.

General reaction of amino acids on sugars and its biological consequences.
Compt. Rend. Soc. Biol. 72, 599, (1913)

92. MAILLARD, L. C.

Action des acides aminés sur les sucres.
Formation de mélanoidines par voie méthodique.
Compt. rend. hebdomadaire. Séances Acad. Sci. 154, 66, (1912)

93. MATTHEWS, D. M., D. H. SMYTH

The intestinal absorption of amino acid enantiomorphs.
J. Physiol. 126, 96, (1954)

94. MATTHEWS, D. M., L. LASTER

Kinetics of intestinal active transport of five neutral amino acids.
Am. J. Physiol. 208, 593, (1965)

95. MATTHEWS, D. M., G. WISEMAN

Transamination by the small intestine of the rat.
J. Physiol. 120, 55 P, (1953)

96. MATTHEWS, D. M., L. LASTER

Competition for intestine transport among five neutral amino acids.
Am. J. Physiol. 208, 601, (1965)

97. MAURON, J., F. MOTTU, E. BUJARD, R. H. EGLI

The availability of lysine, methionine, tryptophan in condensed milk and milk powder. In vitro digestion studies.
Arch. Biochem. Biophys. 59, 433, (1955)

98. MAURON, J., F. MOTTU
Relationship between in vitro lysine availability and in vivo protein evaluation in milk powder.
Arch. Biochem. Biophys. 77, 312, (1958)
99. MAURON, J. Einfluß von Wärme auf die Nahrungsmittelprodukte.
Int. Z. Vitaminforschung 34, 96, (1964)
100. MAURON, J. Le comportement chimique des protéines lors de la préparation des aliments et ses incidences biologiques.
J. Int. Vitaminol 40, 209, (1970)
101. MEISTER, A., J. WHITE
Growth response of the rat to the ketoanalogues of leucine and isoleucine.
J. Biol. Chem. 191, 211, (1951)
102. MUNCK, B. G. Amino acid transport by the small intestine of the rat. On the counterflow phenomenon as a cause of the accelerating effect of leucine on the transintestinal transport of diamino acids.
Biochim. Biophys. Acta 120, 282, (1966)
103. MUNCK, B. G. Amino acid transport by the small intestine of the rat. An evaluation of the possibility of vitamin B₆ as an intestinal amino acid carrier.
Biochim. Biophys. Acta 94, 136, (1965)
104. MUNCK, B. G. Amino acid transport by the small intestine of the rat. The effect of amino acid pre-loading on the trans-intestinal amino acid transport by the everted sac preparation.
Biochim. Biophys. Acta 109, 142, (1965)
105. MUNCK, B. G. Amino acid transport by the small intestine of the rat. The transintestinal transport of tryptophane in relation to the transport of neutral and basic amino acids.
Biochim. Biophys. Acta 126, 299, (1966)
106. NEAME, K. D., G. WISEMAN
Transamination by the small intestine in vivo.
J. Physiol. 138, 41 P, (1957)
107. NEAME, K. D., G. WISEMAN
The alanine and oxo acid concentrations in mesenteric blood during the absorption of L-glutamic acid by small intestine of the dog, cat and rabbit in vivo.
J. Physiol. 140, 148, (1958)

108. NEAME, K. D., G. WISEMAN
The transamination of glutamic and aspartic acids during absorption by the small intestine of the dog in vivo.
J. Physiol. 135, 442, (1957)
109. NEIL, M. W.
The absorption of cystine and cysteine from rat small intestine.
Biochem. J. 71, 118, (1959)
110. NEUBERGER, A., F. SANGER
The availability of ϵ -acetyl-D-lysine and ϵ -methyl-DL-lysine for growth.
Biochem. J. 28, 125, (1944)
111. NEUBERGER, A., F. SANGER
The availability of the acetyl derivatives of lysine for growth.
Biochem. J. 27, 515, (1943)
112. NEUBERGER, A., F. SANGER
The metabolism of lysine.
Biochem. J. 28, 119, (1944)
113. NEWAY, H., D. H. SMYTH
The transfer system for neutral amino acids in the rat small intestine.
J. Physiol. 170, 328, (1964)
114. NEWAY, H., D. H. SMYTH
Effects of sugars on intestinal transfer of amino-acids.
Nature 202, 400, (1964)
115. OXENDER, D. L., N. CHRISTENSEN
Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich Cell.
J. Biol. Biochem. 238, 3686, (1963)
116. PAIK, W. K., BLOCH, L. FRANKENTHAL, SM. BIRNBAUM
Epsilon-lysine-acylase.
Arch. Biochem. Biophys. 69, 56, (1957)
117. PAIK, W. K., L. BENOITON
Purification and properties of hog kidney epsilon-acylase.
Can. J. Biochem. Physiol. 41, 1643, (1963)

118. PERAINO, C., A. E. HARPER
Concentrations of free amino acids in blood plasma of rats force-fed L-glutamic acid, L-glutamine or L-alanine.
Arch. Biochem. Biophys. 97, 442, (1962)
119. PISANO, J. J., J. S. FINLAYSON, M. P. PEYTON
Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII: ϵ -(γ -glutamyl)lysine.
Science, Wash. 160, 892, (1968)
120. RECHCIGL jr., M., J. K. LOOSLI, H. H. WILLIAMS
The utilization of D-leucine for growth by the rat.
J. Biol. Chem. 231, 829, (1958)
121. REISER, S., P. A. CHRISTIANSEN
Intestinal transport of amino acids as affected by sugars.
Am. J. Physiol. 216, 915, (1969)
122. REISER, S., P. A. CHRISTIANSEN
A cross-inhibition of basic amino acid transport by neutral amino acids.
Biochim. Biophys. Acta 183, 611, (1969)
123. REISER, S., P. A. CHRISTIANSEN
Stimulation of basic amino acid uptake by certain neutral amino acids in isolated intestinal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta 247, 102, (1971)
124. REYNOLDS, T. M.
Chemistry of non enzymatic browning.
I. The reaction between aldoses and amines.
Advances in Food Res. 12, 1 (1963)
125. REYNOLDS, T. M.
Chemistry of non enzymatic browning
II. Advances in Food Res. 14, 167, (1965)
126. ROBINSON, J. W. L., J. P. FELBER
A survey of the effect of other amino acids on the absorption of L-arginine and L-lysine by the rat intestine.
Gastroenterologia 101, 330, (1964)

127. ROBINSON, J. W. L., J. P. FELBER
The absorption of dibasic amino-acids by
rat intestinal slices.
Biochem. Z. 343, 1, (1965)
128. ROBINSON, J. W. L.
Interactions between neutral and dibasic
amino acids for uptake by the rat intestine.
European J. Biochem. 7, 78, (1968)
129. ROSE, W. C., M. J. COON, G. F. LAMBERT, E. E. HOWE
The amino acid requirements of man
VIII. The metabolic availability of the
optical isomers of acetyltryptophane,
J. Biol. Chem. 212, 201, (1955)
130. ROSENBERG, T., W. WILBRANDT
Uphill transport induced by counterflow.
J. Gen. Physiol. 41, 289, (1957)
131. ROSENBERG, T., W. WILBRANDT
Carrier transport uphill
I. General
J. theoret. Biol. 5, 288, (1963)
132. SACHS, L. Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag 1968
133. SCARBIERI, V. C., J. AMAHA, M. TANAKA, C. O. CHICHESTER
Nutritional consequences of the Maillard
Reaction. Amino acid availability from
fructose-leucine and fructose-tryptophan
in the rat.
J. Nutr. 103, 657, (1973)
134. SCHARRER, E., H. ZUCKER
Untersuchungen über den Verzehrsrückgang
bei proteinreicher Ernährung.
III. Veränderung der Aminosäurenresorptions-
geschwindigkeit durch Adaptation an eiweiß-
reiche Ernährung.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde.
23, 169, (1967)
135. SCHARRER, E.
Ernährungsbedingte adaptive Veränderungen
der intestinalen Aminosäurenresorption.
Habil. Schrift, München 1971
136. SCHARRER, E.
Untersuchungen über den aktiven intestina-
len Aminosäuretransport bei Küken.
Arch. Geflügelkunde 35, 21, (1971)

137. SCHARRER, E., J. BRÜGGEMANN

In-vitro-Studien zur Aminosäurenresorption
I. Untersuchungen an umgestülpten Dünndarm-
säcken unterschiedlich vorgefütterter Ratten.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 27,
327, (1971)

138. SCHARRER, E.

In vitro studies on amino absorption
II. Different amino acid transport.
Pattern in rat jejunum and ileum.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 31,
200, (1973)

139. SCHEDL, H. P., C. E. PIERCE, A. RIDER, J. A. CLIFTON

Absorption of L-methionine from human small
intestine.
J. Clin. Invest. 47, 417, (1968)

140. SCHIMMING, H.

Über die Abhängigkeit der Aminosäuren-,
Glukose- und Wasserresorption von der Mahl-
zeitenaufnahme.
Med. vet. Diss. München (1972)

141. SCHLOTKE, B.

Untersuchungen über den Zeitverlauf der
durch proteinreiche Ernährung hervorgerufe-
nen Adaption des intestinalen Aminosäuren-
Transports.
Med. vet. Diss. München (1972)

142. SCHULTZ, S. G.

The interaction between sodium and amino
acid transport across the brush border of
rabbit ileum: A plausible molecular model.
In: The molecular basis of membran function.
D. C. Tosteson editor. Prentice Hall, Inc.
Englewood Cliffs N. J. 401 (1969)

143. SCHULTZ, S. G., L. YO-TO, O. O. ALVAREZ, P. F. CURRAN

Dicarboxylic amino acid influx across brush
border of rabbit ileum. Effects of amino acid
charge on the sodium-amino acid interaction.
J. Gen. Physiol. 56, 621, (1970)

144. SHEERIN, H. E., F. H. BIRD

Studies on the competitive absorption of
neutral amino acids from the avian small
intestine.
J. Nutr. 102, 1563, (1972)

145. SPENCER, R. P., K. R. BRODY, F. E. VISHNO
Role of the carboxyl group in intestinal
amino acid transport.
Biochim. Biophys. Acta 117, 410, (1966)
146. STEINER, M., S. J. GRAU
Effects of starvation on the intestinal
amino acid absorption.
Am. J. Physiol. 217, 747, (1969)
147. SULLIVAN, T. W., H. R. BIRD
Effect of quantity and source of dietary
Nitrogen on the utilization of the hydroxy
analogues of methionine and glycine by chicks.
J. Nutr. 62, 143, (1957)
148. THOMPSON, E., R. J. LEVIN, M. J. JACKSON
The stimulating effect of low pH on the
amino acid transferring systems of the
small intestine.
Biochim. Biophys. Acta 196, 120, (1970)
149. TOENNIES, G., M. A. BENETT, G. MEDES
The availability of homocystine to support
rat growth in the absence of dietary choline
and methionine.
Growth 7, 251, (1943)
150. TZE-FEI WONG, J.
The possible role of polyvalent carriers
in cellular transports.
Biochim. Biophys. Acta 24, 102, (1965)
151. VALLE-RIESTRA, J., R. H. BARNES
Digestion of heat-damaged egg albumen by
the rat.
J. Nutr. 100, 873, (1970)
152. VARNISH, S. A., K. J. CARPENTER
The influence of propionylation and heat
treatment on the value of proteins as
sources of amino acids for chicks.
Proc. Nutr. Soc. 29, 451, (1970)
153. V. DU VIGNAUD, SEALOCK, VAN ETEN
The availability of D-tryptophan and its
acetyl derivative to the animal body,
J. Biol. Chem. 98, 565, (1932)

154. WAIBEL, P. E., K. J. CARPENTER
Mechanism of heat damage in proteins
3. Studies with γ -(γ -L-glutamyl)-L-lysine.
Br. J. Nutr. 27, 509, (1972)
155. WEBER, G. Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbarkeit
bei hitzegeschädigten Proteinen.
II. Erhitzung von Proteinen allein und mit
Fetten.
Med. vet. Diss. München (1972)
156. WEST, H. D., H. E. CARTER
Synthesis of alpha-amino-beta-hydroxy-N-
butyric acids VI. Preparation of d- and
l-allothreonine and nutritive value of
the four isomers.
J. Biol. Chem. 122, 611, (1938)
157. WHALER, B. C.
The metabolism of amino acids by the small
intestine.
J. Physiol. 130, 278, (1955)
158. WILSON, T. H., G. WISEMAN
The use of sacs of everted small intestine
for the study of the transference of sub-
stances from the mucosal to the serosal
surface.
J. Physiol. 123, 116, (1954)
159. WISEMAN, G. Preferential transference of amino acids
from amino acid mixtures by sacs of ever-
ted small intestine of the golden hamster
(*Mesocricetus auratus*).
J. Physiol. 124, 414, (1955)
160. WISEMAN, G. Active transport of amino acids by sacs
of everted small intestine of the golden
hamster (*Mesocricetus auratus*).
J. Physiol. 133, 626, (1956)
161. WISEMAN, G. Absorption of amino acids using an in vitro
technique.
J. Physiol. 120, 63, (1953)
162. WRETTLIND, K. A. J.
Replacement of valine in the diet by
alpha-keto-isovaleric acid.
Acta Physiol. Scand. 27, 183, (1952)

163. WRETTLIND, K. A. J.
The availability of the isopropyl ester of L- and D-phenylalanine and 3,6-dibenzyl-2,5-diketopiperazine for growth in rats.
Acta Physiol. Scand. 30, 97 (1954)
164. WRETTLIND, K. A. J.
The utilization of D-valin for growth in rats.
Acta Physiol. Scand. 36, 119, (1956)
165. WRETTLIND, K. A. J.
The availability for growth and the toxicity of L- and D-phenylalanine.
Acta Physiol. Scand 25, 276, (1952)
166. WERETLIND, K. A. J.
The effect of D-amino acids on the stereo-naturalization of D-methionine.
Acta Physiol. Scand 25, 267, (1952)
167. WORK, E. "Some comparative aspects of lysine metabolism" in Mc. Elroy, W. D., Glass, B. H. "Amino-acid metabolism" Baltimore. John Hopkins Press p. 462 - 490 (1955)

NACHTRAG

168. GRIMM, F. Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbarkeit nach Erhitzung von Proteinen mit verschiedenen Kohlenhydraten.
Med. vet. Diss. München 1973
169. MOTTU, F. Helvetica. Chim. Acta (1972) (in press)
170. HURREL, R., K. J. CARPENTER
Proceedings of the Nutrition Society 32, 55 A (1973)
171. ERBERSDOBLER, H.
Persönl. Mitteilung (1974)

172. ULLRICH, K. J.

Anatomie eines Epithels. Analyse des Stofftransportes durch den proximalen Nierentubulus.

Naturwissenschaften 60, 290 - 297, (1973)

173. BAUMANN, K., K. C. HUANG

Micropuncture and microperfusion study of L-glucose secretion in rat kidney.

Pflügers Archiv 305, 155, (1969)

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. DDr. Dr.h.c.mult. Johannes Brüggemann für die Überlassung des Themas sowie für die sehr guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Helmut Erbersdobler gilt mein besonderer Dank für die mir jederzeit gewährte Förderung und Anregung meiner Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. Scharrer sei für zahlreiche Hinweise und Ratschläge gedankt.

Bei Fr. Andrea Brandt möchte ich mich für die Unterstützung bei der Synthese der Versuchssubstanzen bedanken.

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Lebenslauf

Am 2. September 1945 wurde ich, Friedrich Alfke, als Sohn des Dipl. Ing. Herbert Alfke und seiner Ehefrau Elfriede, geborene Breil, in Bruck geboren.

Von 1951 - 1956 besuchte ich die Volksschule in München und von 1956 - 1966 das Ludwigsgymnasium in München. 1966 schloß ich dort mit dem Abitur ab und immatrikulierte mich im selben Jahre an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Dort bestand ich im November 1971 die Tierärztliche Prüfung.

Die Bestallung als Tierarzt wurde mir im Dezember 1971 erteilt.

